

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜRKİYE’NİN DOĞU ANADOLU POPÜLASYONUNDA
ÖZOFAGUS KANSERİ VE *p21* POLİMORFİZMLERİ
ARASINDAKİ İLİŞKİ**

Moleküler Biyolog Burak Muğdat KARAN
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Zehra KAYA

VAN-2018

Bu araştırma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından TYL-2017-6480 numaralı proje ile desteklenmiştir.

KABUL VE ONAY

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Burak Muğdat Karan tarafından hazırlanan "Türkiye'nin Doğu Anadolu popülasyonunda Özofagus Kanseri ve p21 Polimorfizmleri Arasındaki İlişki" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 12/10/2018

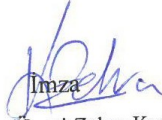

İmza

Prof. Dr. Ayşe Özer

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji AD

Jüri Başkanı


İmza

Dr. Öğr. Üyesi Zehra Kaya

Van YYÜ Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji AD

Jüri Üyesi


İmza

Prof. Dr. Yasin Tütlüce

Van YYÜ Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji AD

Jüri Üyesi

Tez hakkında alınan jüri kararı, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.


İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “*Türkiye'nin Doğu Anadolu Popülasyonunda Özofagus Kanseri ve p21 Polimorfizmleri Arasındaki İlişki*” başlıklı tezim; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Bu tezdeki bütün bilgiler akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak hazırlanıp, bu kural ve ilkeler gereği, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yapılmış ve kaynak gösterilmiştir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Burak Muğdat KARAN

12/10/2018

İmza:

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillenmesini sağlayan değerli tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi. Zehra Kaya'ya,

Lisansüstü eğitimim süresince engin bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, deneyimleri ile bana yol gösteren değerli hocalarım Prof. Dr. Yasin Tülüce, Doç. Dr. Halil Özkol ve Dr. Öğr. Üyesi Gökhan Görgişen'e,

Çalışmamda hastaların belirlenmesi, kan örneklerinin toplanması ve hasta analizlerinin yapılmasında desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Necatı Almalı'ya,

Tez verilerimin istatistiksel analizi süresince desteğini esirgemeyen sayın hocam Dr. Öğr. Üyesi Can Ateş'e,

Çalışmama gönüllü olarak katılan bütün katılımcılara ve bu süreçte hastanede yardımcı olan tüm hastane çalışanlarına,

Fakültede ki çalışmalarımda olsun, örnek toplamamda olsun bana her zaman desteklerini esirgemeyen oda arkadaşım Zafer Yaren'e, yüksek lisans arkadaşım Selva Tufan'a, stajyerlerimiz Gülay Baran'a ve Nurten Çalım'a,

Eğitimim süresince maddi ve manevi fedakarlıklarını eksik etmeyen her anımı benimle yaşayan anneme, babama ve kardeşlerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

KARAN BM. ,Türkiye'nin Doğu Anadolu popülasyonunda özofagus kanseri ve *p21* polimorfizmleri arasındaki ilişki, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Van, 2018 Özofagus kanseri dünya genelinde en yaygın sekizinci kanser türüdür. Türkiye'nin Doğu Anadolu Bölgesinde özofagus kanserine yakalanma oranı oldukça yüksektir. Hücre büyüme döngüsünü düzenleyen *p21*, normal büyüme ve farklılaşma için çok önemlidir. Birçok epidemiyolojik çalışma, *p21*'deki polimorfizmlerin özofagus ve diğer kanserler ile ilişkisini incelemiştir. Bu çalışmanın amacı, Türkiye'nin Doğu Anadolu bölgesinde özofagus kanserli hastalarda *p21* polimorfizmlerinin (rs1059234 C/T, rs1801270 C/A ve rs3176352 G/C) görülme sıklığını ve muhtemel ilişkisini araştırmaktır. Bu polimorfizmler protein ekspresyonunu etkileyebilir ve kanser duyarlılığında rol oynayabilir. Literatürde diğer popülasyonlarda bazı çalışmalara rastlanmış, ama Türkiye'de bu polimorfizmler ile özofagus kanseri arasındaki ilişkiyi gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma, 2017-2018 yılları arasında 69 hasta ve 101 sağlıklı kontrol grubundan toplanan örnekler üzerinde gerçekleştirilmiştir. Gerçek zamanlı PCR'da Taqman Assay yöntemi ile genotipleme yapılmış ve istatistiksel analizler yapılarak sonuçlar belirlenmiştir. *p21* polimorfizmlerinin allel ve genotip frekanslarında hasta ve kontroller arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Ayrıca bu polimorfizmler ve diğer klinik özellikler arasında da bir ilişki görülmemiştir. Bununla birlikte özofagus kanser riskinin ailede kanser, sigara kullanımı, Van otlu peyniri, tandır dumanı ve reflü gibi diğer faktörler ile ilişkili olduğunu gözlemledik ($p < 0,05$). Bulgularımız Türkiye'nin Doğu Anadolu popülasyonunda diğer demografik faktörlerin özofagus kanser riskini arttırabileceğini, fakat *p21* polimorfizmleri (rs1059234 C/T, rs1801270 C/A ve rs3176352 G/C) ve özofagus kanseri riski arasında bir ilişki olmadığını göstermiştir ($p > 0,05$). Bu sonucun doğrulanması için diğer genetik faktörlerin ve daha fazla vakanın incelenmesine ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Genotipleme, gerçek zamanlı PZR, Özofagus kanseri, *p21*, polimorfizm,

ABSTRACT

KARAN BM., Relationship between esophageal cancer and *p21* polymorphisms in Eastern Anatolia population of Turkey , Universty of Van Yuzuncu Yil, Institute of Health Sciences, Department of Medical Biology, M.Sc. Thesis, Van, 2018 Esophageal cancer is the eighth most common cancer type worldwide. The incidence of esophageal cancer is quite high in the eastern region of Turkey. *p21*, which regulates the cell growth cycle, is crucial for normal growth and differentiation. Many epidemiological studies have examined the association of *p21* polymorphisms with esophagus and other cancers. The aims of this study were to investigate the incidence and possible relationship of *p21* polymorphisms (rs1059234 C/T, rs1801270 C/A and rs3176352 G/C) in patients with esophageal cancer in Turkey's Eastern Anatolia region. These polymorphisms can affect protein expression and play a role in cancer susceptibility. In the literature it has been found in some studies in other populations, but did not find a study showing the relationship between this polymorphism with esophageal cancer in Turkey. This study was performed on samples collected from 69 patients and 101 healthy control groups between 2017 and 2018. Genotyping was performed by Taqman Assay method in real time PCR and the results were determined by statistical analysis. There was no statistically significant difference between patients and controls in allele and genotype frequencies of *p21* polymorphisms. There is also no association between these polymorphisms and other clinical features. However, we observed that the risk of esophageal cancer was associated with other factors such as cancer in the family, smoking, Van herbed cheese, tandoor fumes and reflux. Our findings indicate that in Eastern Anatolia population of Turkey, other demografic factors may increase the esophageal cancer risk, but there is no association between *p21* polymorphisms (rs1059234 C/T, rs1801270 C/A and rs3176352 G/C and risk of esophageal cancer ($p>0,05$). Further studies with larger number of cases and other genetic factors are necessary to verify this study.

Keywords: Genotyping, Real Time PCR, esophageal cancer, *p21*, polymorphism,

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL VE ONAY	II
ETİK BEYAN.....	III
TEŞEKKÜR.....	IV
ÖZET	V
ABSTRACT.....	VI
İÇİNDEKİLER	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	X
ŞEKİLLER LİSTESİ	XI
TABLolar LİSTESİ.....	XII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser	3
2.1.1. Kanser Nedir	3
2.1.2. Kanser Hücreleri ve Normal Hücreler Arasındaki Farklar	4
2.1.3. Kanser Nasıl Oluşur	4
2.2. Özofagus	6
2.2.1. Özofagus Çevresi	7
2.2.2. Özofagus Kanseri	9
2.2.2.1. Özofagus Skuamöz Hücre Karsinomu (SCC)	10
2.2.2.2. Özofagus Adenokarsinom (ADC)	11
2.2.3. Özofagus Kanseri Gelişimini Artıran Sebepler.....	12
2.2.3.1. Cinsiyet ve Yaş	12
2.2.3.2. Reflü	13
2.2.3.3. Van Otlı Peynir Tüketimi	13
2.2.3.4. Sigara Kullanımı	13
2.2.3.5. Alkol Kullanımı	14
2.2.3.6. Besin Tüketimi	14
2.2.3.7. Obezite	14
2.2.3.8. Genetik Faktörler	15

	Sayfa
2.3. p21 Özellikleri.....	15
2.3.1. p21'in Düzenlenmesi	17
2.3.2. p21 ve Hücre Döngüsü.....	18
2.3.3. p21 ve Apoptoz	21
2.3.4. p21 ve Kanser Arasındaki İlişki.....	24
2.3.5. p21 ve Özofagus Kanseri Arasındaki İlişki	24
2.4. Tek Nükleotid Polimorfizmleri (SNP).....	25
2.4.1. SNP Uygulama Analizleri.....	26
2.4.1.1. Doğrudan İlişkilendirme Analizleri.....	26
2.4.1.2. Bağlantılı Çalışmalar	27
2.4.1.3. Dolaylı İlişkilendirilen Çalışmalar	28
2.4.2. p21 Polimorfizmleri	28
2.4.2.1. rs3176352 (IVS2+16 G>C)	28
2.4.2.2. rs1801270 (p21 kodon31, C98A).....	29
2.4.2.3. rs1059234 (C70T).....	29
2.4.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Kantitatif PZR).....	30
2.4.3.1. Taqman Tekniği (Applied Biosystem)	30
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	32
3.1. Çalışma Grubu ve Kontrol Grubunun Seçilmesi	32
3.2. Çalışma ve Kontrol Grubundan Biyolojik Materyal Toplanması.....	32
3.3. Kullanılan Kimyasallar	33
3.4. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler.....	33
3.5. DNA İzolasyonu.....	33
3.6. DNA Miktar ve Saflığının Ölçülmesi	34
3.7. Genotipleme	34
3.7.1. Gerçek Zamanlı PZR (Kantitatif PZR).....	34
3.8. İstatistiksel Analiz.....	36
4. BULGULAR.....	38
4.1. Demografik Bulgular	38
4.2. SNP Analizleri	40
4.2.1. Genotip Frekansları.....	40

	Sayfa
4.2.2. Allel Frekansları.....	42
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	44
KAYNAKLAR	49
ÖZGEÇMİŞ	58
EKLER.....	59
EK1. Etik Kurul Belgesi	59
EK2. Tez Orjinallik Raporu	61
EK3. Anket Formu	62
EK4. Hasta Onay Formu	63



SİMGELER VE KISALTMALAR

ADC	: Adeno karsinom
ALL	: Akut Lenfoblastik Lösemi
CDK	: Siklin Bağımlı Kinaz
CKI	: Siklin Kinaz İnhibitörü
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
G	: Dakikadaki dönüş sayısı
IR	: Kızıl Ötesi
ml	: Mililitre
NES	: Nükleer Çıkış Sinyali
NFκB	: Nükleer Faktör kappa B
ng	: Nanogram
NLS	: Nükleer Lokalizasyon Sinyali
nm	: Nanometre
OD	: Optik Yoğunluk
OEC	: Özafagus Kanseri
P53RE	: p53 Duyarlı elementler
PCNA	: Çoğalan Hücre Nükleer Antijeni
pRB	: Retina Blastom Proteinleri
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
kantitatif-PZR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SCC	: Skuamöz Hücreli Karsinom
sn	: Saniye
SNP	: Tek Nükleotid Polimorfizmi
TGFβ	: Tümör Büyüme Faktörü Beta
μl	: Mikrolitre
°C	: Santigrat derece (Celsius)

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Sindirim sistemi yolu	7
Şekil 2. Reflü oluşum bölgesi	8
Şekil 3. Özofagus kanserlerinin yerleşim yerlerine göre insidansları	10
Şekil 4. Adenokarsinom Tümörü	12
Şekil 5. <i>p21</i> 'in lokalize olduğu 6. Kromozom	16
Şekil 6. <i>p21</i> geninin fonksiyonel alanlarının şematik gösterimi	16
Şekil 7. <i>p21</i> 'in hücre içi proteinlerle etkileşimi	17
Şekil 8. <i>p21</i> 'i düzenleyen proteinler	18
Şekil 9. <i>p21</i> ve hücre döngüsü düzenlemesi	21
Şekil 10. <i>p21</i> ve apoptoz	23
Şekil 11. <i>p21</i> rs3176352 (IVS2+16 G>C) polimorfizm	29
Şekil 12. <i>p21</i> rs1801270 (C/A) polimorfizm	29
Şekil 13. <i>p21</i> rs1059234 (C/T) polimorfizm değişimi	29
Şekil 14. <i>p21</i> gen polimorfizmleri allel dağılımları	29

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1. Bir örnek için kantitatif-PZR reaksiyon karışım içeriği	35
Tablo 2. Kantitatif-PZR sıcaklık değerleri	35
Tablo 3. Özofagus kanseri ve kontrol grubunun demografik özelliklerinin karşılaştırılması	38
Tablo 4. Özofagus kanserli hastalarda ve kontrol grubunda <i>p21</i> genotip frekansları ...	41
Tablo 5. Özofagus kanserli hastalarda ve kontrol grubunda <i>p21</i> allel frekansları	43



1.GİRİŞ

Birçok hastalığın ve kanserin nedenleri arasında, hem genetik hem de çevresel faktörler yer almaktadır. Bu etmenlerin önemlilik derecesi, hastalığın veya kanserin tipine göre değişiklik göstermektedir. Günümüzde çeşitli hastalıkların nedenlerinin belirlenmesinde, özellikle moleküler epidemiyolojik yaklaşımlar tercih edilir. Bu yaklaşımların asıl amacı, zararlı çevresel etmenleri ve kanserin oluşmasındaki riskleri belirlemektir. Karsinogenez, biyolojik değişiklikleri barındıran ve zaman alan uzun bir süreçtir. Bundan dolayı bu süre içerisinde meydana gelen anormal biyolojik olaylarla ilgili geliştirilen farklı biyolojik göstergeler ve moleküler epidemiyoloji çalışmaları hastalığın belirteçleri olarak tercih edilmektedir. Bu biyolojik göstergeler, hastalığa sebep olan etmenleri, bireysel duyarlılığı veya hastalığın erken aşamalarında gözlenen etkilerin değerlendirilmesini amaçlar.

Farklı kanser türlerinin nedenleri ile ilgili yeni hipotezler üzerinde araştırmalar yapılsada, bu kanserlere neden olan biyolojik yollar tam olarak saptanamamıştır. Bu konu da yapılan çalışmalar; hastalık riski yüksek olan bireylerin belirlenmesini, çevresel ve genetik risk faktörlerinin belirlenmesini, premalin ve malin hastalıklar ile ilgili biyolojik göstergelerin önceden belirlenmesini amaçlamaktadır. Genetik risk faktörlerinin belirlenmesinde öncelikli olarak, karsinogen metabolizmasında, DNA onarımında, hücre döngüsünün kontrolünde, hücre ölümünde ve immün cevapta rol alan genlerdeki polimorfizmler incelenir (Wild ve ark., 2002). Genetik polimorfizmi hakkında yapılan çalışmalar, bireylerin maruz kaldığı etkenler ve hastalıklara olan duyarlılıklarının incelenmesini sağlar. Son zamanlarda riskli genotiplerin kombinasyonlarının incelenmesi hastalığa olan duyarlılığın belirlenmesinde daha da önem kazanmıştır.

Biyolojik göstergelerin geliştirilmesine olanak sağlayan karsinogenezin erken aşamasında ortaya çıkan genetik değişimlerin belirlenmesi özellikle yüksek risk barındıran bireylerin kanserden korunmasına olanak sağlayabilir. Geç aşamada belirlenenler ise hastalığın tedavisinde kişisel tedavi yöntemlerinin seçilmesini sağlayabilir.

Özofagus kanser gelişiminde *p21* gen polimorfizimleri önemli rol oynar. Daha önceden *p21* polimorfizimleri farklı popülasyonlarda yapılan çalışmalar ile tespit edilmiş

ve bu popülasyonlarda özofagus kanseri ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir. Fakat Türkiye popülasyonunda bu polimorfizm ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu tezdeki amacımız; Türkiye’de özofagus kanserli hastalarda *p21* gen polimorfizmlerinin belirlenmesi, sağlıklı kişiler ile karşılaştırılması ve klinikopatolojik verilerle ilişkisinin araştırılmasıdır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

2.1.1. Kanser Nedir

Kanser, ilgili hastalıkların bir koleksiyonuna verilen isimdir. Tüm kanser türlerinde, vücudun bazı hücreleri sürekli olarak ve çevreleyen dokulara yayılmadan bölünmeye başlar (National, 2018).

Kanser, trilyonlarca hücreden oluşan insan vücudunda hemen hemen her yerde başlayabilir. Normal olarak, insan hücreleri vücudun ihtiyaç duyduğu gibi yeni hücreler oluşturmak için büyür ve bölünür. Hücreler yaşlandığında veya hasar gördüklerinde ölür ve yeni hücreler yerini alır. Ancak kanser geliştiğinde, bu düzenli süreç bozulur. Hücreler gittikçe daha anormal hale gelir, yaşlı veya hasarlı hücreler ölmeleri gerekirken hayatta kalır ve ihtiyaç duyulmadığında yeni hücreler oluşur. Bu ekstra hücreler durmadan bölünebilir ve tümörler olarak adlandırılan büyümeye neden olabilir (National, 2018).

Birçok kanser, doku kitlesi olan katı tümörleri oluşturur. Lösemiler gibi kan kanserleri genellikle katı tümörler oluşturmaz (National, 2018).

Kanserli tümörler malindir, yani yakın dokulara yayılabilir veya o dokuları istila edebilirler. Ek olarak bu tümörler büyüdükçe, bazı kanser hücreleri kan veya lenf sistemi yoluyla vücuttaki uzak yerlere taşınabilir (metastaz) ve orijinal tümörden uzak yeni tümörler oluşturabilir (National, 2018).

Kötü huylu tümörlerden farklı olarak, iyi huylu tümörler yakın dokulara yayılmazlar veya onları işgal etmezler. Bununla birlikte, benin tümörler bazen oldukça büyük olabilir. Benin tümörler, genellikle geri büyümeyen, kötü huylu tümörler bazen büyüme gösterir. Vücudun başka bir yerinde en iyi huylu tümörlerden farklı olarak, benin beyin tümörleri hayatı tehdit edebilir (National, 2018).

2.1.2. Kanser Hücreleri ve Normal Hücreler Arasındaki Farklar

Kanser hücreleri normal hücrelerden başka şekillerde farklılık gösterirler, bu da onların kontrol dışına çıkmasına ve invaziv olmasına neden olur. Önemli bir fark, kanser hücrelerinin normal hücrelerden daha az uzmanlaşmış olmasıdır. Yani, normal hücreler, spesifik fonksiyonlarla çok farklı hücre tiplerine olgunlaşırken, kanser hücrelerinde bu özellik yoktur. Bu da, normal hücrelerden farklı olarak kanser hücrelerinin durmadan bölünmeye devam etmesinin bir nedenidir (National, 2018).

Buna ek olarak, kanser hücreleri normal olarak hücrelerin bölünmeyi durdurmalarına ya da programlanmış hücre ölümü (apoptoz) olarak bilinen bir sürece başladığını söyleyen sinyalleri göz ardı edebilmektedir (National, 2018).

Kanser hücreleri, bir hücreyi çevreleyen ve besleyen normal hücreleri, molekülleri ve kan damarlarını etkileyebilir; bu, mikro çevre olarak bilinir. Örneğin, kanser hücreleri, büyümeleri gereken oksijeni ve besinleri olan tümörleri besleyen kan damarları oluşturmak için yakındaki normal hücreleri indükleyebilir. Bu kan damarları ayrıca, atık ürünleri tümörlerden de uzaklaştırır (National, 2018).

Kanser hücreleri ayrıca, bağışıklık sistemini, organları, dokuları ve vücudu enfeksiyonlardan ve diğer hastalıklardan koruyan özelleşmiş hücrelerden kaçınabilir. Bağışıklık sistemi normal olarak vücuttan hasar görmüş veya anormal hücreleri çıkarsa da, bazı kanser hücreleri bağışıklık sisteminden gizlenebilir (National, 2018).

Tümörler canlı kalmak ve büyümek için bağışıklık sistemini de kullanabilirler. Örneğin, kaçak bir bağışıklık tepkisini normal olarak engelleyen belirli bağışıklık sistemi hücrelerinin yardımıyla, kanser hücreleri bağışıklık sistemini kanser hücrelerini öldürmekten koruyabilir (National, 2018).

2.1.3. Kanser Nasıl Oluşur

Kanser genetik bir hastalıktır, yani hücrelerimizin özellikle de nasıl büyüdükleri ve bölündükleri şeklini kontrol eden genlerdeki değişikliklerden kaynaklanır ve çevrenin etkisi de büyüktür (National, 2018).

Kansere neden olan genetik değişiklikler ebeveynlerimizden miras alınabilir (kalıtsal). Ayrıca, bir kişinin yaşamı boyunca, hücre bölünmesi veya belirli çevresel etkenlerin neden olduğu hasar nedeniyle DNA'da ortaya çıkan hataların bir sonucu olarak ortaya çıkabilir. Kansere neden olan çevresel etkenler, tütün dumanındaki kimyasallar , güneşten gelen ultraviyole ışınları ve radyasyon gibi maddeleri içerir. Her bireyde meydana gelen kanser hastalığı, kişinin genetik değişikliklerin kombinasyonunu gösteririr. Kanser büyümeye devam ettikçe, ek değişiklikler meydana gelecektir. Aynı tümör içinde bile, farklı hücreler farklı genetik değişikliklere sahip olabilir (National, 2018).

Genel olarak, kanser hücreleri DNA'daki mutasyonlar gibi normal hücrelerden daha fazla genetik değişime sahiptir. Bu değişikliklerin bazılarının kanserle ilgisi olabildiği gibi bazıları da olmayabilir (National, 2018).

Kansere katkıda bulunan genetik değişiklikler, üç ana gen tipini (proto-onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA onarım genleri) etkileme eğilimindedir. Bu değişiklikler kanserin “sürücülerini” olarak adlandırılır (National, 2018).

Proto-onkogenler normal hücre büyümesi ve bölünmesinde rol oynarlar. Bununla birlikte, bu genler belirli yollarla değiştirildiklerinde veya normalden daha aktif olduklarında, hücrelerin aşırı büyümesine neden olarak kanser oluşturan genler (onkogenler) haline gelebilirler (National, 2018).

Tümör baskılayıcı genler, hücre büyümesini ve bölünmesini kontrol etmede de rol oynar. Tümör baskılayıcı genlerdeki bazı değişikliklere sahip hücreler kontrolsüz bir şekilde bölünebilir (National, 2018).

DNA tamir genleri, hasarlı DNA'nın sabitlenmesinde rol oynamaktadır. Bu genlerdeki mutasyona sahip hücreler, diğer genlerde ek mutasyonlar geliştirmeye eğilimlidir. Bu mutasyonlar hücrelerin kansere dönüşmesine neden olabilir (National, 2018).

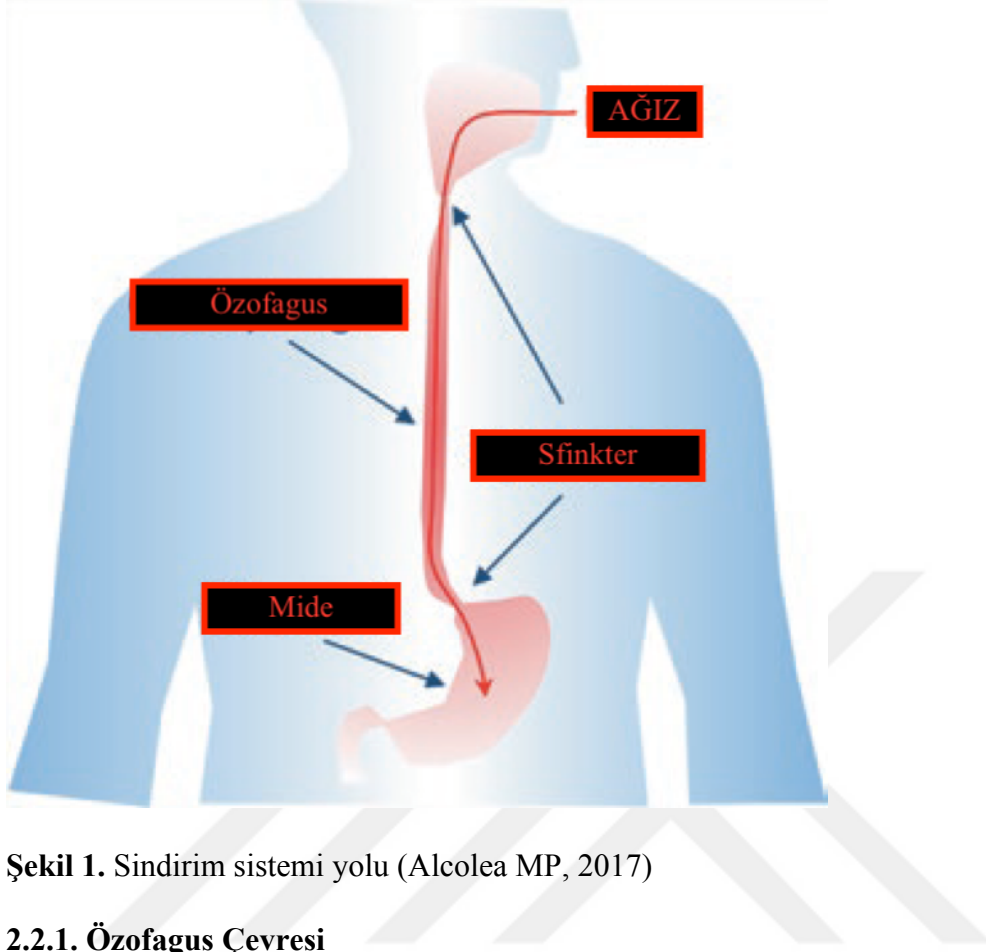
Bilim adamları kansere yol açan moleküler değişiklikler hakkında daha fazla şey öğrendikçe, bazı mutasyonların sıklıkla birçok kanser türünde meydana geldiğini bulmuşlardır. Bu nedenle, kanserler bazen, sadece vücutta geliştikleri yerde değil, kanser

hücrelerinin mikroskop altında nasıl göründükleri ile değil, onları süren genetik değişimlerin türleri ile karakterizedir (National, 2018).

2.2. Özofagus

Özofagus (yemek borusu), dış çevreyi midemize bağlayan nispeten karmaşık olmayan bir tüptür. Sindirim ve sıvıların vücutta emilmesi için yiyecek ve sıvıları taşımak için araç olarak işlev görür (Şekil 1). Bu organ gastrointestinal sistemin bir parçasını oluştursa da, onun önemli işlevi, yutulan maddeleri tek yönlü olarak taşımaktır, burada herhangi bir gıda işleme veya emilim gerçekleşmez (Goetsch, 1910).

Özofagus fonksiyonu göz önüne alındığında, bu organın mimarisi mide ve bağırsak gibi diğer gastrointestinal organlara kıyasla nispeten basittir. Her ne kadar hayvanlar arasında histolojik farklılıklar olsa da, özofagus, dış lümen tarafında bir epitel doku, mukoza tabakası, vasküler ve bağ dokusu bulunabilen alt mukoza ve muskularis dışında oluşur. Bu kas tabakası, iskeletten düz kaslara özofagusun mide tarafına doğru kasları sınıflandırır. Bu kas sınıflaması, isteyerek yutkunmanın özofagusun sonuna doğru bir refleks oluşmasını sağlayarak, sindirim için mideye yiyecek veya içecek verilmesini sağlar. Gastroözofageal kavşakta sfinkter, reflü tek yönlü taşınımı sağlar (Goetsch, 1910).



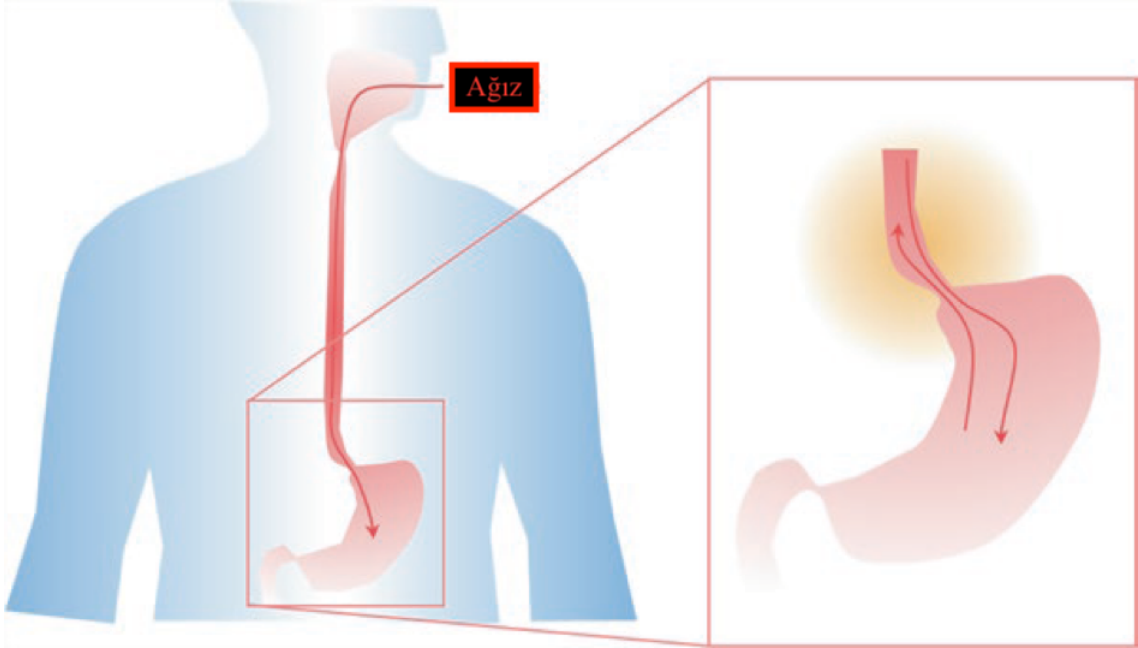
Şekil 1. Sindirim sistemi yolu (Alcolea MP, 2017)

2.2.1. Özofagus Çevresi

Özofagusun en dış tarafı, mukoza veya özofagusa ait epitelyum, dışarıdan doğrudan temas halindedir. Gastrointestinal yolun, bu ve ağız boşluğunun epitelyal mukozası, işlenmemiş yutulmuş malzemeye doğrudan maruz kalan kısım olacaktır. Bu malzemeler, sıcak çay infüzyonları veya kahve gibi nispeten yüksek sıcaklıklı ürünler, soğuk içecekler, sigara içenlerde sigara dumanı, alkol tüketimi ve ilaç gibi kimyasal maddeler de dahil olmak üzere çevre kirletici maddeler, gıda koruyucuları, renklendirme ve tekstüre maddeleri olarak sıralanabilir (Lin ve ark., 2016; Tetreault, 2015; Fitzgerald, 2005). Bütün bunlar, sindirilmemiş gıda parçaları tarafından dokunun fiziksel olarak aşınmasıyla şiddetlenir. Bu dokunun maruz kaldığı sürekli aşınma ve yıpranma, işlevselliği, dayanıklılığı ve nihayetinde hayatta kalmayı sağlamak için dayanıklı bir astar gerektirir. Bu dayanıklılık, çok tabakalı yüksek derecede esnek bir doku oluşturan yüzeye doğru katmanlaşan yüksek devir frekansı ile birkaç epitel hücresi katmanı tarafından oluşturulan bir yassı epitel ile elde edilir (Alcolea ve Jones, 2015).

Özofagus epitelyal astarı, gündelik saldırganlıklara karşı direnç gösterse de, epitelyumun zarar görmesi sonucu özofagus hastalığına hatta kansere yol açması ile sonuçlanabilir. Bunun açık bir örneği asit reflüsüdür (Fitzgerald, 2005).

Normal koşullar altında, tüm sindirilen maddeler mideye sadece bir yönde nakledilir. Yemek borusu ve mide arasındaki kavşaktaki sfinkter, yemek borusundan kurtulmak için rahatlar, yemek borusunun, mide sindirim salgılarının güçlü asit bileşiminden korunması için kapatılır. Bazı koşullar altında asidin bir kısmı yemek borusuna geri akar, gastrik reflü olarak bilinen bir hastalık ortaya çıkar (Şekil 2) (di Pietro ve Fitzgerald, 2013). Bu reflüye sık sık maruz kalmak, özofageal iltihaplanmaya yol açabilir ve özofageal adenokarsinoma (EAC) gelişim potansiyeline sahip Barrett's özofagusu (BE) gibi daha ileri özofagus hastalıklarına dönüşebilir (Desai ve ark., 2012).



Şekil 2. Reflü Oluşum Bölgesi (Alcolea MP, 2017)

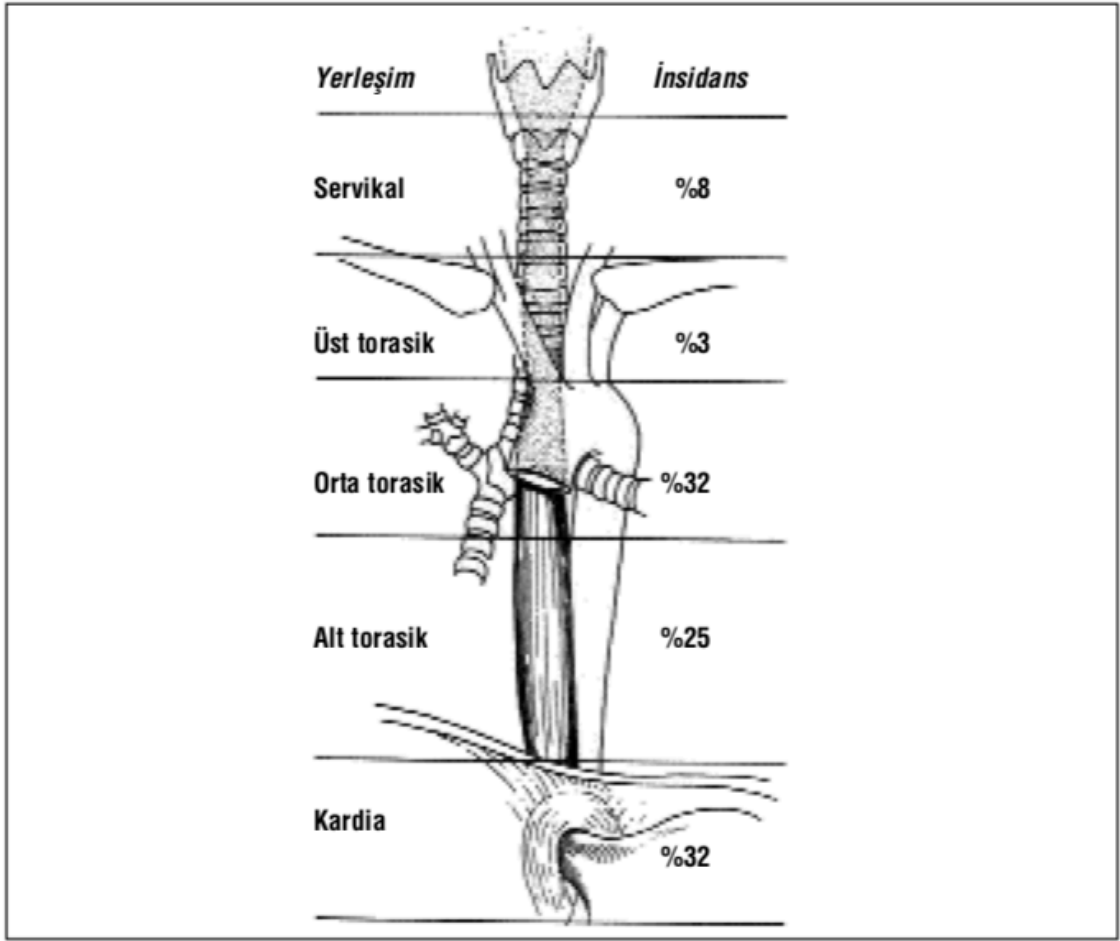
Bu organın maruz kaldığı sürekli sert çevre koşulları, korunma ve işlevlerini belirler. Hastalığa ve kansere yol açabilecek toleransını aşan tacizlere karşı hassas hale gelir.

2.2.2. Özofagus Kanseri

Özofagus kanseri dünya genelinde en yaygın sekizinci kanser türü ve altıncı en sık görülen kanser ölüm nedenidir (Rustgi ve El-Serag, 2014). Son zamanlardaki tıbbi ilerlemelere rağmen, bu hastalık hala klinikte geç kalmaktadır ve prognozu kötü seyretmektedir, 5 yıllık sağkalım oranı ise sadece %10-25'dir. İki ana histolojik alt tipi; skuamöz hücreli karsinom (SCC) ve adenokarsinom (AC)'dir (Penathur ve ark., 2013; Napier ve ark., 2014).

İki büyük özofagus kanser alt tipinin görülme sıklığı, farklı çevresel ve beslenme faktörlerine bağlı coğrafik nedenler ile ortaya çıkar. SCC, tüm özofagus kanserlerinin % 90'ında görülür. SCC'ler ağırlıklı olarak Türkiye, kuzeydoğu İran, Kazakistan ve aynı zamanda kuzey ve orta Çin'i de içine alan Asya kuşağında yüksektir. Bu tür kanserin başlıca risk faktörleri tütün ve alkol tüketimidir; bununla birlikte, diyet, çevresel kirlenmeler ve özellikle sıcak içecekler gibi diğer faktörlerin, bu kanser tarafından gösterilen farklı coğrafik etkileri etkilediği öne sürülmüştür (Penathur ve ark., 2013; Agrawal ve ark., 2012).

Skuamöz hücreli karsinom ve adenokarsinom özofagus karsinomunun en çok görülen iki tipidir. En sık görülen özofagus kanseri tipi skuamöz hücreli kanserdir. Genellikle özofagusun üst tarafında skuamöz hücreli kanserler çoğunlukla mültisantriktirler, %25'inden fazlasında senkron tümör bulunur. Skuamöz hücreli kanselerde intramukozal evreden öteye invazyon intraepitelyal yayılma, direkt stromal invazyon ve intraduktal yayılma ile olur. Özofagusun alt kısmı ve kardiada en sık adenokarsinom bulunur. Özofagus ve kardiada yerleşen adenokarsinom genellikle batı kısmında artmaktadır. Adenokarsinomlar tanı konulduğunda invaziftirler, mültisantrik değildirler, proksimal submukozal ve distal subserozal yayılım gösterirler. Ayrıca melanom, granüler hücreli miyoblastom, lenfoma, leyomiyosarkoma, fibrosarkoma, rabdomiyosarkoma ve lenfosarkoma gibi çok sayıda ender görülen tümörleri de vardır (Ferguson ve Skinner, 1991). Özofagus ve kardias kanserleri servikal özofagusta %8, üst torasik özofagusta %3, orta torasik özofagusta %32, alt torasik özofagusta %25 ve kardiada %32 oranında görülür (Şekil 3) (Peters ve DeMeester, 1999).



Şekil 3. Özofagus kanserlerinin yerleşim yerlerine göre insidansları (Ozcelik MF., 2001)

ADC'nin SCC'ye göre anlamlı derecede farklı bir etiyolojisi vardır. ADC'nin uzun süreli gastrik reflü sonucu anormal glandüler (salgı bezi) farklılaşmadan kaynaklandığı ileri sürülmüştür (Leedham ve ark., 2008; Chang ve ark., 2007). Bu kanser, gastrik reflüden kaynaklanan premalin bir durum olan obezite, kötü beslenme alışkanlıkları ve Barrett özofagusundaki artışın bir sonucu olarak Avrupa ve Kuzey Amerika'daki en hızlı artma olaylarından birini oluşturmaktadır (Penathur ve ark., 2013; di Pietro ve ark., 2014).

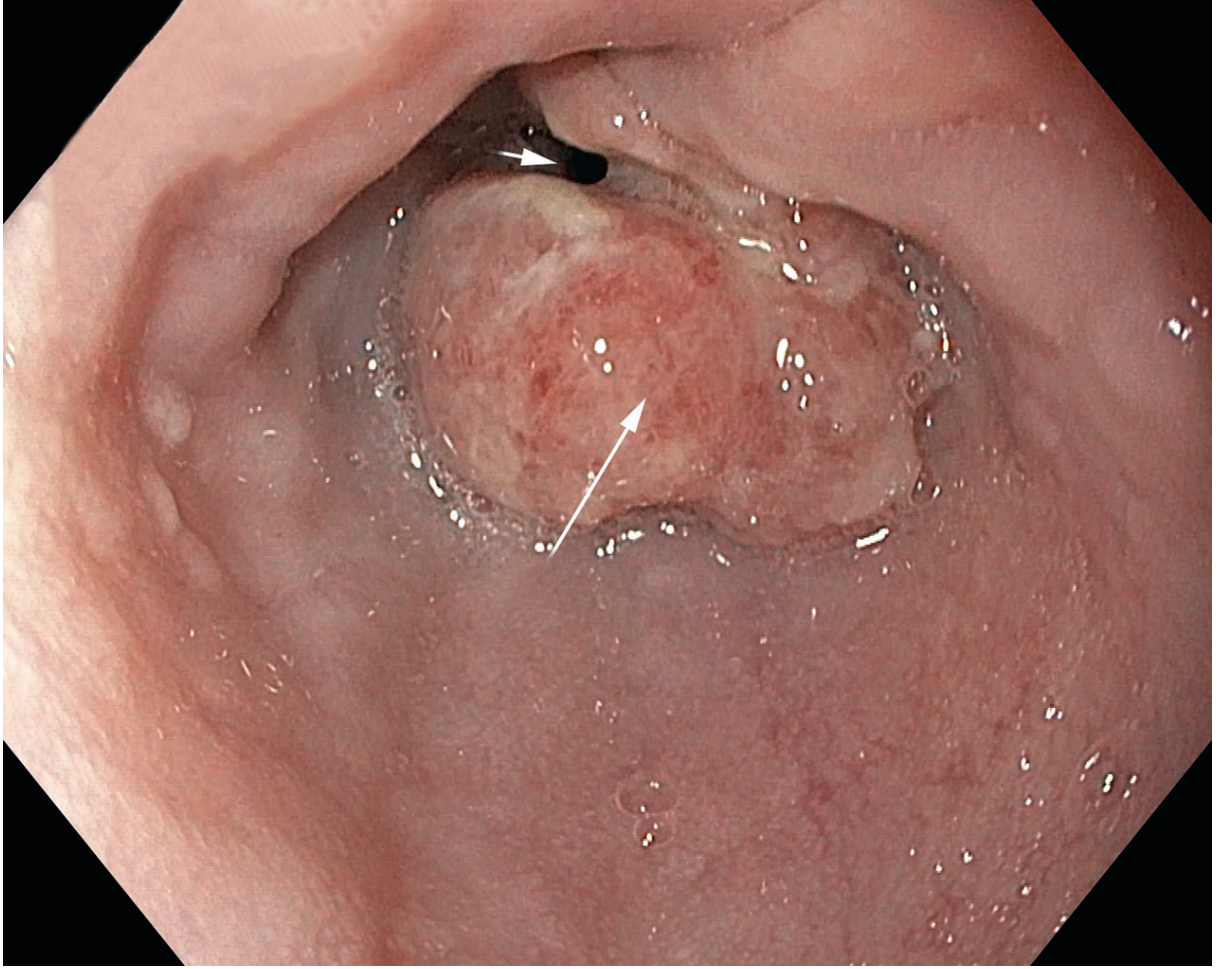
2.2.2.1. Özofagus Skuamöz Hücre Karsinomu (SCC)

Özofagus skuamöz hücreli karsinomun patofizyolojik yolu tipik olarak özofagus mukozası ile doğrudan temasta bulunan karsinojenik bileşikler tarafından başlatılır. Mekanik yaralanma (örn., Akhalaziden, radyasyon terapisi, sıcak içecekler veya sodyum hidroksiti yutmak gibi) karsinojenik bileşiklere karşı hassasiyeti artırır. SCC için temel

çevresel risk faktörleri` ; tütün içimi ve beraberinde aşırı alkol tüketimidir (Prabhu ve ark., 2014). Besin faktörleri arasında, meyve ve sebze alımı koruyucu etkisi olduğu (Liu ve ark.,(a) 2013), kırmızı et tüketimi (Qu ve ark., 2013) ve çok sıcak içeceklerin tüketilmesi yer almaktadır (Chen ve ark., 2015). Genom çalışmalarında, SCC için yeni duyarlılık lokusları bulunması (Wu ve ark., 2014) genetik faktörlerinde etkili olduğunu göstermiştir. Tütün sigarasının bırakılması, muhtemelen en etkili birincil koruyucu önlem olacaktır (Bosetti ve ark., 2006).

2.2.2.2. Özofagus Adenokarsinom (ADC)

Özofagus adenokarsinomunun ana patofizyolojik yolunun kronik gastroözofageal reflü hastalığı olması muhtemeldir, bu da doğal skuamöz hücre mukozasından Barrett özofagusu olarak bilinen özel bir sütunlu epitele metaplaziye neden olur (Spechler ve Souza, 2014). Bu durum düşük dereceli displazi, yüksek dereceli displazi ve invaziv AC'ye ilerleyebilir (Spechler ve Souza, 2014). AC için ana çevresel risk faktörleri reflü, ve obezite iken *Helicobacter pylori* enfeksiyonu; meyve ve sebzelerin diyet alımı ve muhtemelen steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçlar da koruyucu niteliktedir (Lagergren ve Lagergren, 2013). *Helicobacter pylori* enfeksiyonunun azalan etkinliği ile birlikte reflü ve obezitenin artan etkinliği muhtemelen AC oranının artmasına neden olmaktadır (Şekil 4) (Lagergren ve Lagergren, 2013). Araştırmalar şimdiler de Barrett özofagusuyla ilişkili karsinogenez için risk lokasyonlarını tanımlamışlardır (Buas ve ark., 2017; Ek ve ark., 2016; Lagergren ve ark., 2015; Gharakhani ve ark., 2016). Bu bulgular, AC riski yüksek bireylerde kişiye özel önlemleri inceleyen araştırmalara yardımcı olabilir.



Şekil 4. Adenokarsinom Tümörü (Alcolea MP, 2017)

2.2.3. Özofagus Kanseri Gelişimi Artıran Sebebler

2.2.3.1. Cinsiyet ve Yaş

Özofagus kanseri dünyada erkeklerde daha sık görülen bir kanser türüdür. 1952'de yapılan kolektif çalışmaların ilk serisinde kadın-erkek oranı 1/20 iken, son yayınlarda bu oran 1/2 ve 1/4 arasındadır. Bazı coğrafik bölgelerde yapılan çalışmalarda erkek hasta sayısı fazlayken, bazı bölgelerde kadın ve erkek sayısı eşittir. Bizim bölgemizde ise son zamanlarda yapılan çalışmalarda özofagus kanserine yakalanan kadınların sayısının erkeklerden daha fazla olduğu görülmektedir (Eroğlu ve ark., 2016).

Özofagus kanseri 40 yaşın altındaki kişilerde son derece nadirdir ve oranı her on yılda artar (Turkyilmaz ve ark., 2009). Bu kansere yakalanma yaş ortalaması bölgelerde farklılık gösterebilmektedir.

2.2.3.2. Reflü

En güçlü ve en iyi karakterize özofagus kanser riski gastroözofageal reflüdür. Uzun yıllar süren kanıtlar, özofagus kanserinin, tabakalı özofagus epitelyumunun, kronik gastrik reflünün güçlü çevresel koşullarına yanıt olarak metaplastik bir süreçte kolumnar intestinal epitel ile yer değiştirdiği premalin bir durum olan Barrett özofagusuna bağlamıştır. Ancak, bu bilgiye rağmen, adenokarsinom, batı ve gelişmiş ülkelerde son birkaç yıldır görülme sıklığındaki artışa bağlı olarak endişe kaynağı olmaya devam etmiştir (Lagergren ve Lagergren, 2013).

2.2.3.3. Van Otlı Peynir Tüketimi

Doğu Anadolu Bölgesi'nde bu hastalığın görülmesindeki sebeplerden biri olarak otlu peynir tüketimi gösterilmektedir (Turkdogan ve ark.,1996). Bunun sebebi ise otlu peynirin içinde bulunan otlarda nitrit ve nitrat oranının yüksek olmasıdır. Nitrat ve nitrit dışarıdan vücuda direkt olarak alındığı gibi nitrat, sindirim sisteminde bulunan bazı mikroorganizmalar tarafından da nitrite indirgenebilmektedir. Nitritin bu şekildeki oluşumu; nitratın alınma miktarı, hızı ve gıdalardan serbest hale geçmesi gibi faktörlere bağlıdır. Nitritler vücutta mevcut olan sekonder aminlerle reaksiyona girerek kanserojen nitrozaminleri oluşturabilmektedirler. Bütün bu zincirleme reaksiyonlar aşamasında nitrat ve nitrit bileşikleri doza bağlı olarak akut ve kronik zehirlenmelere sebep olmaları yanında kanserojenik olaylarla da ilişkili olabilmektedir (Servi, 1993).

Otlu peynir yapımında bir çok farklı bitki türü kullanılıyor. Bunların içerisinde *Allium sp.* (sirmo), *Anthriscus nemorosa* (mendi, mendo), *Ferula sp.* (heliz), siyabo *Ferula sp.* (siyabo) ve *Thymus sp.* (kekik) bitkisinin en çok bilinen ve kullanılan bitkiler olduğu bildirilmektedir (Baytop, 1994).

2.2.3.4. Sigara kullanımı

Orta dereceden ağır içiciler, hem SCC hem de ADC'nin artmış riski ile karşı karşıyadır. Araştırmalar, bir tütünün içine konması durumunda, tütün kanserojenlerinin, özellikle de nitroz aminlerin özofagus mukozası ile temas etmesine neden olduğunu

göstermektedir. Kişinin günlük içtiği sigara miktarı ile özofagus kanserine yakalanma riski arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir (Zhang Y, 2013).

2.2.3.5. Alkol Kullanımı

Alkol SCC için açık bir risk faktörüdür. Nispi risk (RR), haftalık hacmine bağlı olarak 1,8 ve 7,4 litre arasında değişen alkol miktarıyla birlikte artar (Wheeler ve Reed, 2012).

2.2.3.6. Besin tüketimi

Çay ve kahve, özofagus karsinomu ve coğrafi dağılımı ile ilişkili potansiyel risk faktörleri olarak kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır. Hem tüketilen miktar hem de sıcaklık ile bağlantılı karsinojenite ile olan ilişkisi hakkında çok az kanıt vardır (Wheeler ve Reed,2012). Azotlu bileşenlerden oluşan zengin besinler, Çin'in belirli bölgelerinde yüksek oranda SCC görülme sıklığı ile ilişkilidir. 2003 yılında yayınlanan bir meta-analizde, bu tür bileşiklerle zengin gıdalar tüketmeyenlere kıyasla tüketenlerde daha fazla bu hastalığa yakalanma riski olduğu görülmektedir (Wheeler ve Reed, 2012).

2.2.3.7. Obezite

Özofageal skuamöz hücreli karsinom (ESCC), düşük sosyoekonomik durumla ilişkilidir. Batı dünyasında artan obezite oranının, özofageal adenokarsinomun artan insidansına katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Daha spesifik olarak, obezitenin intraabdominal basıncı ve gastroözofageal reflüyü spesifik bir mekanizma ile arttırdığı öne sürülmüştür, ancak bazı çalışmalar çelişkili sonuçlar vermiştir. Diğer taraftan, adipoz dokunun kendisi tümör gelişimini etkilemektedir (Lagergen ve Lagergen, 2013). Adipositler ve inflamatuvar hücreler, tümör gelişimini desteklediği bilinen adipokinleri ve sitokinleri salgılar. Tümör mikroçevresindeki adipositlerden bol miktarda lipit bulunması, tümör progresyonunu ve kontrolsüz büyümeyi destekler. Adipositlerin kanser hücresi için önemli bir adipokin ve enerji kaynağı olduğu göz önüne alındığında, kanser hücreleri ve adipositler arasındaki metabolik simbiyoz mekanizmalarını anlamak, yeni terapötik olasılıkları ortaya çıkaracaktır (Zhang, 2013).

2.2.3.8. Genetik Faktörler

SCC gelişimi ile açıkça ilişkili olan otozomal dominant bir hastalık olan Tylosis gibi genetik temelli durumlar bu hastalığın insidansının artmasında etkilidir. Bazı coğrafik bölgelerde yüksek oranda özefagus karsinomu insidansında ailesel agregasyon olduğu bildirilmiştir (Wheeler ve Reed, 2012). Bazı genom boyu ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) ağır alkol ve tütün kullananlarda SCC gelişiminde genetik yatkınlık faktörleri olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca bazı tek nükleotid polimorfizmlerinin de (SNP) bu hastalığa yatkınlıkla ilişkili olduğu görülmüştür (Zheng ve ark., 2014). Başka bir çalışmada, biri fosfolipaz C enziminde ve diğeri kromozom 20'nin belirli bir bölgesinde (C20orf54) bulunan iki lokusta bir ilişki bulunmuştur (Zhang ve ark., 2012). Skuamöz karsinom ile ilgili olarak, 453852 SNP türü Çin popülasyonunda 1898 skuamöz karsinom hastası ve 2100 kontrol grubunu içeren GWAS veri seti gözden geçirilmiştir. Araştırmacılar ilişkili SNP'leri belirleyerek, beş gen ve yedi tane biyolojik yol tanımlamışlardır. Bunların içinde en güçlü 3 tanesi rs4135113, rs1800450 ve rs3769823 olarak belirlenmiştir (Yang ve ark., 2015).

2.3. *p21* Özellikleri

Waf1/cip/p21/CDKN1A olarak da bilinen (Abbas ve Dutta, 2009) CDK inhibitörü *p21*, CDK inhibitörlerinin CIP/Kip ailesine aittir (Gartel, 2006).

İnsanda bu gen, 6 nolu kromozomun 6p21.2 bölgesinde yer almaktadır (Şekil 5) (Duttu ve ark., 2015). Proteini, yaklaşık 18 kDa'lık bir moleküler ağırlığa sahip 164 amino asit içeren bir polipeptiddir (Kriwacki ve ark., 1996). Farklı çalışmalar, *p21*'in N-terminal bölgesinde bulunan, siklin/siklin bağımlı kinaz (CDK) etkileşimlerine özgü amino asit (aa) motiflerini tanımlamıştır (Goubin ve Ducommun, 1995; Chen ve ark., 1996; Fotedar ve ark., 1996; Lin ve ark., 1996; Wohlschlegel ve ark., 2001). Siklin bağlama motifi (Cy1 bölgesi, aa. 17-24), RXL amino asit motifi üzerinde ortalanır. CDK-bağlama motifi (K bölgesi, aa. 53-58), 310 heliks (aa. 74-79) ile bağlantılı olarak, CDK ve rezidülerle temas eder, CDK'nın ATP bağlama bölgesi Tyr-77 (Y77)'yi bloklar, böylece katalitik aktivite inhibe olur (Russo ve ark., 1996). *p21* karboksi terminali, çoğalan hücre nükleer antijeni

(PCNA) ile etkileşir (Chen ve ark., 1996). Bu bölgede PCNA bağlanması için güçlü afinite veren sekiz rezidü dizisi olan PCNA ile etkileşimli protein (PIP) -kutusu bulunur (Warbrick, 1998). PCNA, DNA replikasyonu ve onarımının yanı sıra diğer DNA metabolizması süreçlerinde merkezi bir rol oynayan bir proteindir (Prosperi, 2006; Moldovan ve ark., 2007). *p21*'deki PCNA bağlanma alanı içine gömülmüş olan, siklinlere bağlanabilen ikinci bir RXL motifi (Cy2 bölgesi, aa. 155-157) bulunur (Chen ve ark., 1996). Karboksi terminal bölgesi ayrıca bir nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) (aa. 140-142) (Rodriguez ve ark., 2002) iki nükleus çıkış sinyali (NES) (Hwang ve ark., 2007) ve D-kutusu ve F-kutusu gibi farklı bozunma motifleri içerir (Şekil 6) (Dutto ve ark., 2015).

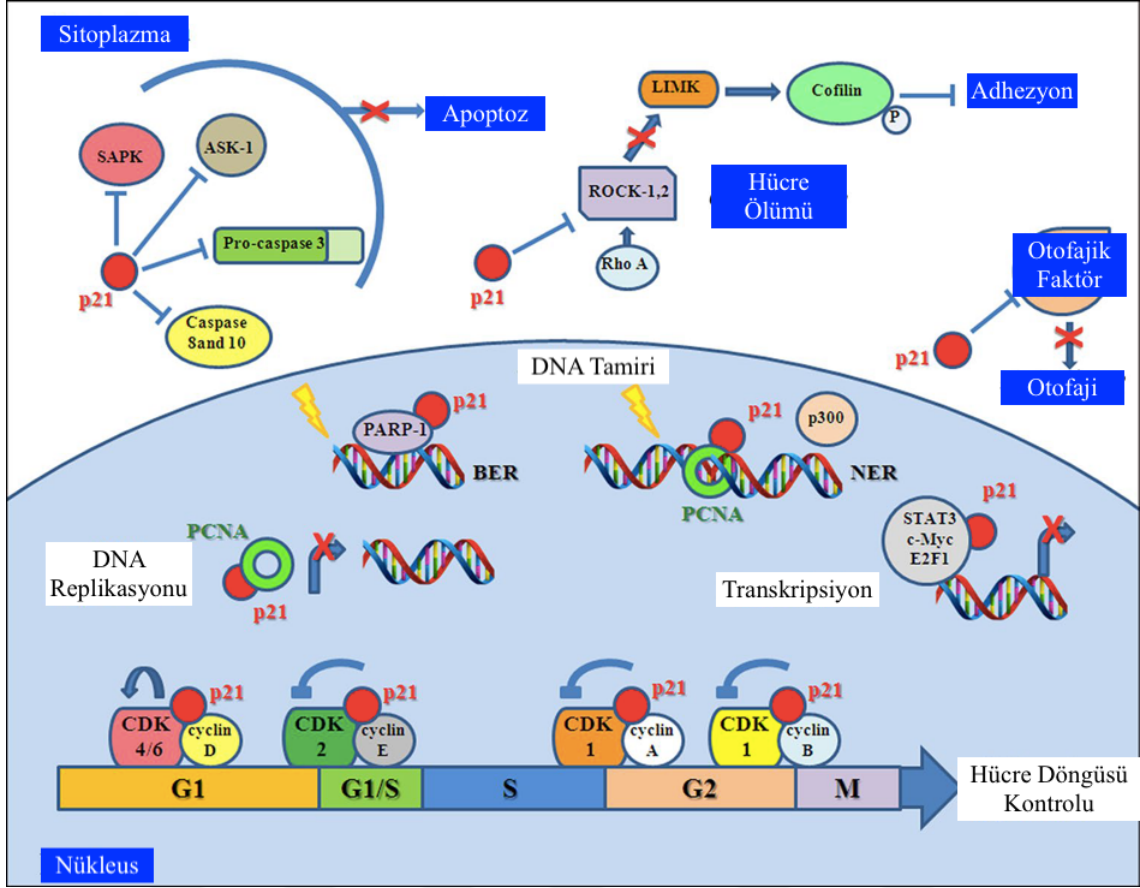


Şekil 5. *p21*'in lokalize olduğu 6. Kromozom (Genecards, 2018).



Şekil 6. *p21* geninin fonksiyonel alanlarının şematik gösterimi (Dutto ve ark., 2015).

Genel olarak, *p21* proteininin fonksiyonları, hücrel lokalizasyonuna bağlıdır, nükleusda ve sitoplazmada oynanan rollerin önemli ölçüde farklı sonuçları vardır (Blagosklonny, 2002). Özellikle, çekirdekte, *p21* bir negatif hücre döngüsü düzenleyicisi olarak işlev görülür. Böylece bir tümör baskılayıcı görevi görür. Sitoplazmada lokalize olduğunda ise apoptozu inhibe ederek ve hücre göçünü ve çoğalmasını kolaylaştırarak bir onkogen olarak hareket eder (Şekil 7) (Cazzalini ve ark., 2010; Cmielova ve Rezac, 2011).



Şekil 7. *p21*'in hücre içi proteinlerle etkileşimi (Dutto ve ark., 2015).

2.3.1. *p21*'in düzenlenmesi

p53, *p21*'in ana transkripsiyon düzenleyicisidir. *p21* promotöründe korunmuş *p53* yanıt elemanları (*p53RE*) içerir. *p63* ve *p73*'ü içeren iki *p53* homoloğu, *p21RE*'ye bağlanarak *p21*'i transaktive edebilir. DNA hasarı ve oksidatif stres de dahil olmak üzere çeşitli stresler, *p53* aktivitesini uyarır ve daha sonra bu durum *p21* ifadesi ile sonuçlanır (Jung ve ark., 2010). *p53* fosforilasyonu, çoklu serin/treonin kalıntıları, *p53* stabilitesini artırarak *p53*'ün transkripsiyonel aktivitesini artırır. Bu da *p21*'in aktivasyonun artmasına sebep olur.

TGF β , SMAD1 ve SMAD3 gibi SMAD'lerin fosforilasyonu ile *p21* ifadesinin düzenlenmesine katkıda bulunduğu bilinmektedir. Ayrıca, mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yolunun aktivasyonu, TGF β 'nın *p21* cevabının artmasına katkıda bulunur, bu da daha sonra TGF β tarafından SMAD6 ve SMAD7'nin fosforilasyonuna sebep olarak *p21*'i inhibe eder. Ayrıca kanser hücrelerinde yüksek seviyelerde c-myc proteini,

CDK aktivasyonuna yol açabilir (Xu ve ark., 2014). D1, D2 ve D3 dahil olmak üzere siklin D, mitojenik sinyalleri algılayan ilk siklidir ve bu nedenle büyüme faktörü sensörleri olarak CDK4 ve CDK6'nın G1 fazını aktive ederler. Benzer şekilde, CDK2'nin siklin E1 ve E2 ile aktivasyonu G1/S geçişine yol açabilir. S fazı sırasında, siklin E proteinlerinin siklin A ile bozunması ve yer değiştirmesi, S fazından mitozaya geçişe yol açar ve son olarak, G2 fazının sonunda CDK2, siklin B ile etkileşir (Pavlidis ve ark., 2016; Hydring ve ark., 2016). CDK'ların hiper-aktivasyonu, düzensiz hücre bölünmesine ve tümör gelişimine neden olabilir. Son yapılan çalışmalarda CDK aktivitesinin CIP/KIP ve INK gibi CDK inhibitörleri (CKI) tarafından kontrol edildiği gösterilmiştir. CIP/KIP ailesi *p21*, *p27* ve *p57*'yi içerirken, INK ailesi *p15*, *p16*, *p18* ve *p19* proteinlerini içerir. INK aile üyeleri CDK4 ve CDK6'ya bağlanır ve siklin D ile etkileşimlerini bloke eder. CIP/KIP aile üyeleri siklin A, E, D/CDK kompleksine bağlanır ve katalitik aktivitesi hücre döngüsünün durmasına neden olur (Wu ve ark., 2003(b); Lee ve ark., 2009; Yagi ve ark., 2003). *p21*, tanımlanacak CKI proteinlerinin ilk üyesidir. *p21*, siklin A/CDK2, E/CDK2, D1/CDK4 ve D2/CDK4 kompleksine bağlanır ve pRB proteinin fosforilasyonunu inhibe eder (Choi ve ark., 2014; Naito ve ark., 2015). DNA hasarı üzerine *p53* ile *p21* indüksiyonu siklin E/CDK2'yi inhibe eder ve böylece G1/S geçişini engeller. Bu durum, siklinD/CDK4, 6 kinaz aktivitesini destekleyebilir. Böylece, G1 yoluyla ilerlemenin indüklenmesi ve *p21*'in aşırı ifadesi CDK1'i potansiyel olarak inhibe edebilir ve G2/M geçişini durdurabilir. *p21*, aynı zamanda, siklin A/CDK1, 2'nin kinaz aktivitesini inhibe ettiği ve S fazında faz döngüsü inhibisyonu ile sonuçlandığı gösterilmiştir (Choi ve ark., 2014). *p21*'in *p53* aracılı indüksiyonu ve ICBP90(terse CCAAT kutu bağlanma proteini, 90 kD)'nın aşağı regülasyonuna yol açar. G1/S ve G2/M fazları sırasında ICBP90 ifadesi gözlenir. ICBP90, DNA replikasyonu ve hücre döngüsü regülasyonunda olduğu için, *p21* ile aşağı yönde regülasyonu, G/S geçişinde tutuklama için önemli bir mekanizmadır (Hatfield ve ark., 2014).

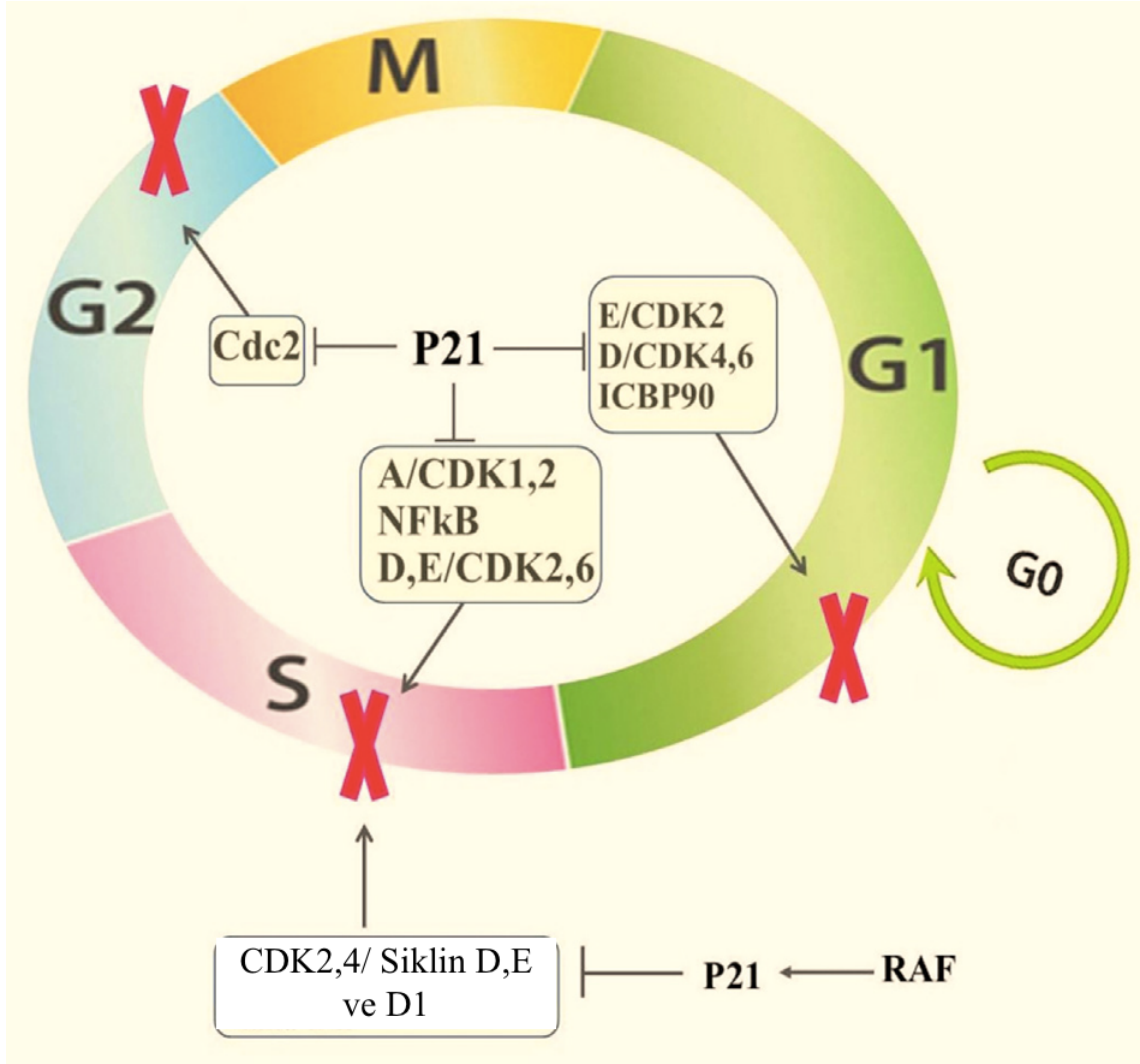
Bazı çalışmalar nükleer faktör kapp B (NFkB)'nin siklin D1'i indüklediğini, ancak diğer araştırmalar, Ikb (baskılayıcı faktör kabba B)'nin, siklin D1 seviyelerini düşürerek S fazı girişini geciktiren NFkB'nin bir süper bastırıcısı olduğunu göstermiştir (Jeong ve ark., 2002).

STAT sinyal yolu, BCL-2, Bcl-XL, siklin D1, c-myc ve *p21* gibi DNA tamir makinelerinin p53 bağımlı bileşenini antagonize eden bazı diğer proteinler gibi birkaç proteinin ekspresyonunu indükler. STAT'in aşırı ekspresyonu G1 hücre döngüsü tutulmasını azaltır, çünkü STAT birçok kanser türünde *p21* ekspresyonunu bastırır ve tümör proliferasyonuna yol açar. Son zamanlardaki yapılan araştırmalarda, sitokin sinyal yolağının baskılanmasının, DNA hasarına karşı hücre döngüsünü durduran etkilerin indüklediğini göstermiştir (Aachmann ve ark., 2007).

RAS yolunun bir aşağı akış yönündeki hedefi olan RAF, *p21* yoluyla hücre döngüsü hapsinde önemli bir fonksiyona sahip olan bir başka faktördür. RAF büyüme aktivitelerinin varlığında MAP kinazı aktive eder ve transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ile hücre çoğalmasını artırır. Son zamanlardaki çalışmalar, yüksek düzeyde RAF indüklemesinin *p21* indüksiyonu ile döngüyü durdurduğunu göstermiştir. Bu işlemde *p21*, CDK2 ve CDK4'e bağlanarak siklin D/E kinaz aktivitesini inhibe eder; bununla birlikte, RAF'ın ılımlı aktivasyonu, Retina blastom (Rb) fosforilasyonu ve S fazı girişinin nihai artışı nedeniyle siklin D1 ve DNA replikasyonunun aktivasyonu için yeterlidir (Hawkes ve ark., 2009). *p21*, sadece N-terminali ve C-terminalindeki Cy1 ve Cy2 (daha zayıf bir fazla motif) motifleri ile değil, aynı zamanda N-terminalinde CDK-bağlama bölgesi aracılığıyla CDK alt birimine bağlanır ve böylece, CDK ve RBL1, RBL2, RB ve CDC25C gibi substratları arasındaki etkileşimleri bozar (Bard-Chapeau ve ark., 2012).

PCNA ayrıca *p21* C-terminali yoluyla *p21*/siklin/CDK kompleksine bağlanır. Bu kompleks, DNA polimeraz-A, ile PCNA'ya bağlanma için rekabet ettiğinden ve DNA sentezinde yer alan diğer birkaç protein, PCNA, DNA replikasyonunu doğrudan inhibe edebilir (Nayak ve ark., 2013; Palazzo ve ark., 2016).

p21'in hücre direncini artırabileceğini bilmek önemlidir. Araştırmacılar insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF1)'in C3 miyoblastlarının kalıcılığını, Akt'ye bağlı bir süreçle *p21*'i düzenleyerek artırabildiğini göstermiştir. Antisens *p21* cDNA'nın ekspresyonu, IGF1 ile indüklenen hücre kalıcılığını inhibe edebilir (Yu ve ark., 2015). Sonuç olarak, *p21*'in hücre bölünmesi üzerinde inhibe edici ve uyarıcı etkileri olabileceği ve *p21* hücre kalıcılığını düzenleyebileceği anlaşılmaktadır (Şekil 9).



Şekil 9. *p21* ve hücre döngüsü düzenlemesi (Karimian ve ark., 2016).

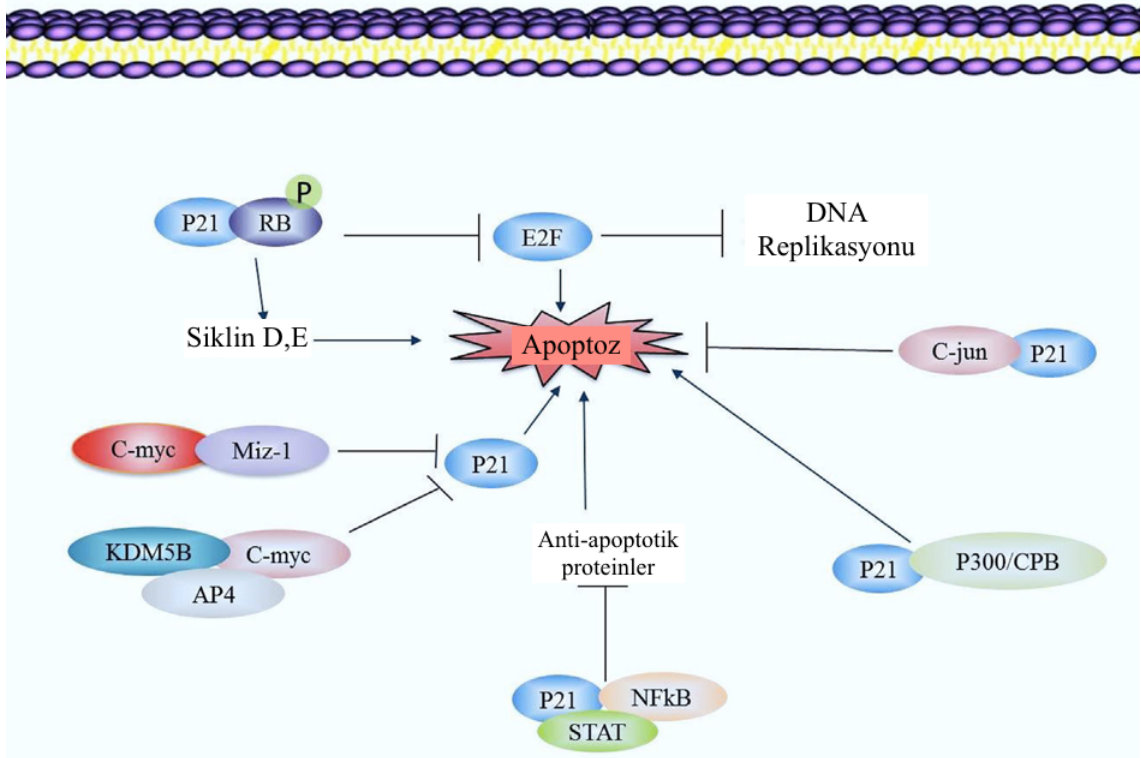
2.3.3. *p21* ve Apoptoz

Birçok çalışma, *p21*'in karsinogenez ve tümörlerin ilerletilmesinde anahtar bir işlevi olduğunu göstermiştir. Apoptoz inhibisyonu *p21*'in en iyi bilinen onkogenik fonksiyonudur. Bu durum, radyasyonla *p21* parçalanmasının tümör oluşumunu azalttığı yapılan deneylerle kanıtlanmıştır (Prives ve Gottifredi, 2008). Birçok çalışma *p21*'in sayısız hücre tipini apoptozdan koruduğunu göstermiştir; örneğin, meme kanserinin

*p21*in hücre dizilerinin aşırı ekspresyonunun, kızılötesi (IR) ile indüklenen apoptoza karşı hücre duyarlılığını azalttığı bildirilmiştir. Ayrıca, daha ileri deneysel çalışmalar, *p21*'in, kaspaz kaskadının aktivasyonu için gerekli olan CDK'ların inhibisyonu yoluyla IR-kaynaklı apoptoza karşı hücreleri koruyabildiği gerçeğine değinmiştir. Ayrıca, *p21*, hücre döngüsü ilerlemesi, DNA onarımı ve apoptozun düzenlenmesi ile ilgili genlerin ifadesinde önemli bir fonksiyona sahiptir. Bu genler arasında E2F (E2 transkripsiyon faktörü) ailesi, NFkB, c-myc, STAT ve p300/CPB bulunur (Soria ve Gottifred, 2010). pRB'nin *p21* tarafından fosforilasyonu, E2F aktivasyonunu inhibe eder ve DNA replikasyonunu büyük ölçüde bloke eder. *p21*'in, E2F aktivitesini inhibe etmesinin bir başka yolu, azaltılmış ekspresyon ve/veya fonksiyonel RB proteini içermemesidir (Wu ve ark., 2009). In vivo olarak E2F-1'in aşırı ekspresyonu, hücre döngüsünün başlatır ve ardından apoptoz aktifleşir. E2F-1, p53'e bağımlı ve bağımsız bir şekilde apoptozu indükleyebilir. Gerçekten de PRB, p53 pozitif ve negatif hücrelerde apoptozu inhibe edebilir. Ayrıca, E2F-1'deki mutasyonlar, pRB'nin E2F-1 aracılı apoptozu bloke etme yeteneğini inhibe eder. Siklinler D1 ve E, pRB'nin hiper fosforilasyonu ile apoptozu uyarır (Jung ve ark., 2010). *p21*, pRB eksik hücrelerde E2F aktivitesini baskılayabilir. Ayrıca, *p21* mutasyonu E2F transaktivasyonunu engelleyebilir (Soria ve Gottifredi., 2010). E2F aktivitesinin düzenlenmesi için iki mekanizma tanımlanmıştır; ilki, E2F'de karboksi terminalinde bulunan bir alanın transaktivasyonu, E2F hedef genlerinin ekspresyonunu önler. İkincisi, pRB, SWI / SNF, histon deasetilazlar ve histon metiltransferazlar gibi transkripsiyonel baskılayıcı faktörleri E2F aktivitesini inhibe eder (Bitomsky ve ark., 2013). C-myc, hücre döngüsü regülasyonu ve farklılaşmasında yer alan diğer önemli bir faktördür. Çok sayıda çalışma c-myc'nin *p21*'i baskılayabildiğini bildirmiştir. C-myc ile *p21* fonksiyonunun bastırılması için çeşitli mekanizmalar vardır, örneğin, MIZ-1 gibi transkripsiyonel faktörlerle c-myc'in etkileşimi *p21*'in transkripsiyonunu inhibe eder. Bu etkileşim *p21* fonksiyonunu bloke eder ve c-myc ile apoptozun indüklenmesine yol açar. C-myc, *p21* promotörüne bağlanan ve *p21* transkripsiyonunu baskılayan transkripsiyonel faktör AP4 ile bağlantı kurabilir. C-myc ayrıca, *p21* transkripsiyonunu baskılayan KDM5B ve transkripsiyon faktörü AP4 gibi histon demetilazlarla ile üçlü bir kompleks oluşturur. C-myc, *p21* mRNA'yı parçalayan mikroRNA (miR) 17-92'yi indükler (Soria ve ark., 2010; Mullan ve ark., 2006). Ayrıca, *p21*'in NFkB ve STAT ile etkileşimi, BCL-2, c-FLIP, BCL-XL ve XIAP gibi anti-

apoptotik proteinlerin inhibe edilmesine yol açar ve apoptozun uyarılmasını kolaylaştırır. Ayrıca *p21*, bu transkripsiyon faktörlerinin anti-apoptotik etkisini P300/CPB gibi transkripsiyonel koaktivatörlerin indüksiyonu ile artırabilir (Soria ve ark., 2010). Bazı yeni çalışmalarda, *p21*'in kaspaz 3 ile kesildiği ve bu işlemin kanser hücresi apoptozuna yol açtığı gözlenmiştir. Ek olarak, tümör nekroz faktör (TNF) ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand ölüm reseptörü (TRAIL) kanser hücrelerinde apoptozu indüklediğinde, *p21* kaspaz 3 ve 9 aktivasyonunu inhibe edebilir ve hücreleri IR-indüklü apoptozu karşı koruyabilir (Soria ve ark., 2010; Seoane ve ark., 2004).

C-jun, çeşitli hücrel streslere yanıt olarak apoptozu indükleyebilir. MAPK ailesine ait c-jun'u aktive edebilen başka proteinler de vardır. Aktive edilmiş c-jun fosforilatları c-myc ve apoptotik kaskadı başlatır. Kanser hücrelerinde *p21*'in aşırı ekspresyonu, c-jun'u inhibe eder ve apoptozu baskılar (Şekil 10) (Soria ve ark., 2010; Meng ve ark., 2013).



Şekil 10. *p21* ve Apoptoz (Karimian ve ark., 2016)

2.3.4. *p21* ve Kanser Arasındaki İlişki

p21, CDK'lara bağlanır ve kinaz aktivitesini inhibe eder, bu da hücre döngüsündeki spesifik aşamalarda büyümenin durmasına yol açar (Abbas ve Dutta, 2009; Gartel ve Tyner, 2002). *p21* ayrıca hücrel farklılaşmayı ve yaşlanmayı indükler.

p21, başlıca tümör baskılayıcılarından biri olmasına rağmen, aynı zamanda onkogenezi de teşvik edebilir. *p21*'in yüksek ifadesi kanserin zayıf prognozu ile ilişkilidir (Winter ve ark., 2001; Xia ve ark., 2004; Zhang ve ark., 1995). Her ne kadar mesane kanserinde *p21* geninin mutasyonu bildirilmişse de (Cazier ve ark., 2014), rapor edilen çalışmaların çoğu, *p21*'in işlev kaybı mutasyonlarını göstermede başarısız olmuştur (McKenzie ark., 1997; Patino ve ark., 1998; Shiohara ve ark., 1994). Bu sonuçlar *p21*'in klasik bir tümör baskılayıcı olamayacağını düşündürmektedir.

Genetik olarak tasarlanmış farelerin deneysel sonuçları da *p21*'in çakışan işlevlerini desteklemektedir. *p21* eksikliği olan farelerde spontan tümörler meydana gelmiş ve *p21*'in bir tümör baskılayıcı olduğu kanısına varılmıştır (Martin–Caballero ve ark., 2001). *p21* ayrıca genomik kararsızlığa neden olur (Shen ve ark., 2005). Bununla birlikte, *p21* eksikliği olan farelerde tümör oluşumunun zamanlaması, daha sonra p53 eksikliği olan farelerden daha fazla olduğu anlaşılmıştır (Donehower ve ark., 1992). Ayrıca, *p21* eksikliği olan fareler p53 eksikliği olan farelerle çaprazlandığında lenfoma oluşumu bastırılmıştır (De La Cueva ve ark., 2006; Wang ve ark., 1997). Bu sonuç, *p21*'in, çok yönlü işlevini yansıtan, özel koşullarda onkojenik bir şekilde hareket ettiğini de gösterir (Abbas ve Dutta, 2009). Ek olarak, *p21*'in sitoplazmada aşırı eksprese edildiği farelerde meme bezi tümörizasyonunu hızlandırdığı (Cheng ve ark., 2010) ve *p21*'in siklin bağı motifinin, doğrudan bir tümörizasyon fonksiyonuna sahip olduğu bildirilmiştir (Liu ve ark., 2007).

2.3.5. *p21* ve Özofagus Kanseri Arasındaki ilişki

Hücre döngüsünün önemli bir düzenleyicisi olan *p21* (*waf1/cip1*), PCNA'ya bağlanır ve bu bağlanma sonucu p53, büyümenin baskılanmasını sağlar ve apoptozu aktif hale getirir (Sherr ve Roberts, 1995). *p21*, siklin kinaz aktivitesini inhibe eder,

transkripsiyon seviyesinde p53 ile sıkı bir şekilde düzenlenir ve muhtemelen p53 hücre döngüsü kontrolünün efektörü olarak işlev görür (Bunz ve ark., 1998).

Hücrede, p53 proteini DNA'yı bağlar ve bu da hücre bölünmesinin bir sonraki aşamasına geçemeyen bir kompleks oluşturan bir hücre bölünmesi uyarıcı protein (cdk2) ile etkileşime giren *p21* ifadesini uyarır. Mutant p53 artık DNA'yı etkili bir şekilde bağlayamaz, bu nedenle *p21* proteini hücre bölünmesi için durdurma sinyali olarak hareket edemez ve kontrolsüz hücre büyümesi nedeniyle tümörler ile sonuçlanabilir (Ohkoshi ve ark., 2015).

1999 yılında yapılan bir araştırmada, kronik olarak düzenlenmiş ESCC tümörü olan ve bilgisayarlı bir görüntü analiz sistemi ile skorlanan hastalardan alınan örneklerde *p21*, *p27*, *p53* ve pRB'nin immünohistokimyasal yöntemiyle ekspresyonunu çalışmışlardır. *p27*, *p53* ve pRB'nin genel sağkalım ile ilişkili olmadığını doğrulamışlardır. Çok değişkenli analiz, yaş, lenf nodu tutulumunun ve *p21*'in bağımsız prognostik faktörler olduğunu, *p21* ekspresyonunun ESCC'de bağımsız bir prognostik faktör olduğu sonucuna varmışlardır (Nita ve ark., 1999).

2000 yılında yapılan başka bir araştırmada atasal tip p53 olan özofagus kanserli hastalardaki *p21* varyantlarının sıklığı ile ilişkili olduğu ve p53 mutasyonları olan tümörlerdekinden daha yüksek olduğunu, bu da bu polimorfizmlerin p53 yolunu etkilediğini ve özofagus tümörjenezinde önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Bahl ve ark., 2000).

2.4. Tek Nükleotid Polimorfizmleri (SNP)

Tek nükleotid polimorfizmleri, hücresel büyüme ve çoğalmayı sağlayan (onkogenler) ile büyümeyi engellemeye çalışanlar (tümör baskılayıcılar) genler arasında bir denge sağlayan, dikkatli düzenlenmiş varyasyonlardır. Büyümeyi kontrol eden genlerin ve bunların protein ürünlerinin değiştirilmiş ifadesi veya aktivitesi anormal hücresel proliferasyona veya tümör oluşumuna yol açabilir. Bu tür genlerin tanımlanması ve karakterize edilmesi, kanser biyolojisini tam olarak anlamak ve kanser tedavisinde yeni terapötiklerin geliştirilebildiği yeni kanser ilaç hedeflerini ortaya çıkarmak için gereklidir. Ek olarak, yeni kanser genlerini keşfetmeye devam etmek, kanser önleme ve

erken tanıya yönelik metodolojilerin geliştirilmesine de yardımcı olacaktır (Engle ve ark., 2006).

Bir hastalık sürecine dahil olan genleri tanımlamak için mevcut olan en güçlü yöntemlerden biri, bir hastalık fenotipine bağlı bir genomik bölgeyi bulmak için çok sayıda polimorfik belirteçin kullanıldığı genetik analizlerin uygulanmasıdır. İnsan genomunda çeşitli tiplerde polimorfik belirteçler bulunur ve genom genelindeki geniş çaplı, yüksek verimli analize en uygun tip tek nükleotit polimorfizmleridir (SNP). Bir SNP, iki veya daha fazla alternatif bazın kayda değer sıklıkta (>% 1) meydana geldiği bir genomik lokus olarak tanımlanır. SNP'ler, genom boyunca birkaç yüz baz çiftinde meydana gelen ve düşük mutasyon oranları sergileyen insan genomundaki en sık görülen varyasyon türüdür (Cargill ve ark., 1999). Bunlar, hastalık aday gen bölgelerini, evrimsel çalışmaları tanımlamak, genotipik ve fenotipik farklılıklar arasında fonksiyonel ilişkiler kurmak için kapsamlı olarak çalışılmıştır. Son zamanlarda, daha yeni teknolojilerin ortaya çıkması, eş zamanlı olarak maliyeti düşürürken, SNP genotiplemesinin verimliliğini arttırmıştır. Daha yeni teknolojiler, SNP'lerin sadece tek bir lokusta değil, daha önce ulaşılamaz olduğu düşünülen yoğunluklarda genom genişliğinde değerlendirilmesine izin vermiştir. Böyle büyük ölçekli, SNP analiz çalışmaları, çeşitli hastalık fenotiplerinin gelişiminde rol oynayan genleri ve genomik bölgeleri belirlemede bazı başarılarla karşılaşmıştır. Bu SNP analiz teknolojileri yeni kanser genlerini tanımlamak için uygulanabilir (Engle ve ark., 2006).

2.4.1. SNP Uygulama Analizleri

2.4.1.1. Doğrudan İlişkilendirme Analizleri

Doğrudan ilişkilendirme çalışmaları, varsayılan fonksiyonel varyantlar ve hastalık riski arasındaki ilişkiyi test eder. Tipik olarak bu, bilinmeyen bölgelerdeki SNP'lerin (bir amino asit değişimi ile sonuçlanan) veya düzenleyici bölgelerde gen ekspresyonunu etkileyen polimorfizmlerin değerlendirilmesini içerir (Crgill ve ark., 1999). Mendelyan hastalıklarda hastalık allellerinin çoğunluğu SNP'leri kodlamakta ve karmaşık hastalık varyantlarının da benzer bir eğilim gösterdiği düşünülmektedir (Botstein ve ark., 2003). Mendel ve karmaşık özelliklerin daha önce ayrı bir fenomen olduğu düşünülse, şimdi

ikisinin çok daha fazla ilişkili olduğuna dair kanıtlar artmaktadır (Badano ve ark., 2002). Sonuç olarak, Mendelyan bozuklukların bilinen nedenlerinin daha iyi anlaşılması, karmaşık hastalık genlerini araştırmaya yardımcı olacak yararlı bilgiler sağlayabilir. Fonksiyonel SNP'lerin analizi, yaygın kodlama SNP'lerinin sayısı toplam ortak SNP sayısının sadece bir kısmı olduğu için, güçlü bir hastalık gen keşfi yöntemi olma potansiyeline sahiptir. Bu yaklaşımın dezavantajı, ilgi konusu gen içindeki fonksiyonel polimorfizmlerin kapsamlı bir listesinin ya SNP veri tabanları ya da DNA dizilemesi gibi deneysel yaklaşımlarla tanımlanması gerektiğidir. Dahası, çoğu zaman kanser ilerlemesinde olduğu gibi, mevcut olmayan SNP veritabanlarında bulunamayan fenotipler mutasyona katkıda bulunabilir. Literatürde, kanser araştırmalarında doğrudan ilişkilendirme çalışmalarının kullanıldığı çok sayıda rapor bulunmaktadır. Örneğin, MMP-9 genindeki iki belirsiz SNP'nin, metastazlı akciğer kanseri gelişme riski ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Hu ve ark., 2005). UGT1A7 içinde kodlanan polimorfizmlerin, kolorektal kanser hastalarının capesitapin'e (kemoterapik bir ilaç) yanıtı ile ilişkili olduğu görülmüştür (Carlini ve ark., 2005). Akut lenfoblastik lösemi (ALL) dahil olmak üzere kemoterapide kullanılan çeşitli tiopurin ilaçlarının S metilasyonunu katalize eden tiopurin metiltransferaz (TPMT) aktivitesi, birkaç kodlama polimorfizmi ile tanımlanır (Otterness ve ark., 1997). ALL'deki erken tedavi yanıtını tahmin etmek için kullanılabilir (Stanulla ve ark., 2005). MTHFR genindeki fonksiyonel ve yaygın polimorfizmler kolorektal kanser (Jiang ve ark., 2005), meme kanseri (Chen ve ark., 2005), mide kanseri (Graziano ve ark., 2006) ve pankreatik kanser ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Li ve ark., 2005).

2.4.1.2. Bağlantılı Çalışmalar

Bağlantı çalışmaları, bir hastalık genini tanımlamak için aile temelli bir analiz yaklaşımıdır. Yöntem, bir hastalık geninin bir aile içinde ayrılmasından dolayı, hastalık genine yakın genomik işaretleyicilerin, hastalık alleli ve işaretleyici arasındaki rekombinasyon eksikliği nedeniyle aynı şekilde ayrılacağı kavramına dayanmaktadır. Bu yöntemi kullanmak için, hastalıktan etkilenen bireyleri içeren aileler tanımlanır ve genom boyunca dağıtılan polimorfik belirteçler, ailenin her bir üyesi için genotiplendirilir. Her markırın ayrılması, daha sonra aile içindeki hastalık fenotipinin segregasyon modeli ile karşılaştırılır. Daha sonra, her bir belirteç için, işaretleyicinin hastalık geni ile ayrılma olasılığını göstermek üzere, olasılıklar skorunun bir logaritması (LOD) hesaplanır.

Polimorfik allellerin segregasyonu, hastalık fenotipinin segregasyonu ile eşleşirse, bu da yüksek bir LOD skoru ile sonuçlanırsa, hastalık geninin polimorfik markırın yakınında yerleştirilebileceğinin bir göstergesidir (Engle ve ark., 2006).

2.4.1.3. Dolaylı İlişkilendirilen Çalışmalar

Bağlantı çalışmalarını gerçekleştirmeye yönelik önemli bir engel, kapsamlı, etkilenen aile örneklerinin elde edilmesinin zor olabileceğidir. İlgisiz olan hastalık fenotipi için ilgisiz kişilerden vaka örnekleri elde etmek genellikle daha kolaydır. Bu ilgisiz popülasyonlar için, belirli bir gen ve bir hastalık fenotipi arasındaki bağlantıyı değerlendirmek için dolaylı bir ilişki çalışması tercih edilir. Dolaylı ilişki çalışmaları, rekombinasyonun, birbirine yakın ve hastalık genine yakın olan çoklu SNP'ler arasında nadiren meydana geldiği kavramına dayanmaktadır. Sonuç olarak, küçük bir bölgedeki SNP'ler genellikle bağlantı dengesizliğindeki (LD) bir blok olarak bulunur. Bu çoklu SNP'ler esasen tek bir birim olarak birbirine bağlandığından, bu ünite içindeki herhangi bir SNP'nin genotiplerini değerlendirmek, bu LD bloğu içindeki tüm SNP'lerin genotiplerini yansıtacaktır. Dolaylı ilişkilendirme çalışmaları ile, nedensel mutasyon doğrudan değerlendirilmemiştir, bunun yerine, aynı LD blokunda SNP'ler, nedensel mutasyon olarak genotiplendirilmiştir. Bir SNP hastalığa neden olan mutasyonla LD'de ise, vaka örneği ile uygun şekilde eşleştirilmiş kontrol popülasyonu arasında bir fark gözlenmelidir (Engle ve ark., 2006).

2.4.2. *p21* Polimorfizmleri

2.4.2.1. rs3176352 (IVS2+16 G>C)

rs3176352 (IVS2+16 G>C), 6. kromozom üzerinde *p21* geninde kırılma (splicing) yerinden 16 baz çifti (bç) aşağı doğru 2. intronda yerleşmiştir ve bu C-G değişimi *p21*'in mRNA kırılmasını etkiler (Zheng ve ark., 2014). SNP minör allel frekansı araması yapıldığında C alleli minör allel olarak verilmektedir, ancak popülasyonlar arasında bakıldığında en sık olarak gözlenen allelin değişkenlik gösterdiği görülmektedir.

İçerik dizisi [VIC/FAM]:
AGCATGACAGGTGCGGACATGTGCA[C/G]GGAAGGACTTTGTAAGGGACCAGGA

Şekil 11. *p21* rs3176352 (IVS2+16 G>C) polimorfizmi (Thermo, 2018). VIC/FAM, allellerin işaretlenmesinde kullanılan boyalardır.

2.4.2.2 rs1801270 (*p21* kodon 31, C98A)

p21'in en çok çalışılan polimorfizmidir. Kodon 31'de meydana gelen rs1801270 C/A, serin'den arjinin'e amino asit değişimi (Ser31Arg) ile sonuçlanır. Bu değişim DNA-bağlayıcı çinko parmak motifini etkiler ve *p21*'in ekspresyonunu ve aktivasyonunu değiştirebilir. (Wang ve ark., 2012). Böylece kansere yatkınlığı etkileyebilir. C alleli yabancı tip allel olarak kabul edilmektedir.

İçerik Dizisi [VIC/FAM]:
GCCCAGTGGACAGCGAGCAGCTGAG[A/C]CGCGACTGTGATGCGCTAATGGCGG

Şekil 12. *p21* rs1801270 (C/A) polimorfizm (Thermo 2018).

2.4.2.3 rs1059234 (C70T)

p21 C70T, 3'-UTR bölgesinde durdurma kodonunun 20 nükleotid aşağısında oluşur. Bu bölge, hücre farklılaşması, proliferasyonu ve tümör baskılanması için önemli bir alan olarak kabul edilir. Bu nedenle, protein ekspresyon seviyesinde bir değişikliğe yol açarak mesajın bozulmasına neden olur ve mRNA kararlılığı etkilenir (Noushin Taghavi ve ark., 2010). C alleli yabancı tip allel olarak kabul edilmektedir.

İçerik Dizisi [VIC/FAM]:
CCCTAATCCGCCACAGGAAGCCTG[T/C]AGTCCTGGAAGCGCGAGGGCCTCAA

Şekil 13. *p21* rs1059234 (C/T) polimorfizm değişimi (Thermo, 2018)

2.4.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Kantitatif PZR)

Kantitatif-PZR teknolojisi DNA'nın ya da mRNA örneklerinin çoğaltımını ve ürünlerinin miktarını tek bir tüpte tespit edebilen son yıllarda popüler olmuş bir yöntemdir. Floresan ışımaya tekniklerinin moleküler genetik yöntemlerde kullanıma girmesi ile birlikte bilinen "PZR" geliştirilerek oluşturulan teknik gen anlatım çalışmalarının hızına ivme kazandırmıştır (Klein, 2002). "PZR" çoğaltımını görünür hale getiren ve monitörize edebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemi olması dolayısıyla "Kantitatif gerçek zamanlı PZR", "İzlenebilir polimeraz zincirleme tepkimesi (PZT)", "Floresan kantitatif gerçek zamanlı-PZR" gibi farklı adlarla da isimlendirilmektedir (Kubista, 2008).

Gen anlatımının belirlenmesi, farklılaşması ve patolojik durumların saptanması için çok önemlidir. Medikal araştırmalarda ve moleküler tanı çalışmalarında biyolojik materyalle çalışırken çok sayıda doku örneğine veya hücre miktarına ihtiyaç duyulur. Kantitatif-PZR metodu ile çok az miktardaki biyolojik bir örneğin özelliğini hızlı, güvenilir ve hassas bir şekilde ortaya koyulabilmektedir. Gen anlatımlarının sayısal bir değerle belirtilmesi bir hücre topluluğundaki heterojeniteden dolayı bu teknolojinin keşfinden önce güvenilir değildi. Çok farklı hücre tiplerinden oluşmuş dokuların dış uyaranlara farklı şekilde yanıt verdiği ve hastalıklardan farklı şekillerde etkilendiği düşünülmektedir. Biyolojik fonksiyonların yanında karmaşık düzenleme mekanizmalarının ardındaki fizyolojiyi tam olarak anlayabilmek için her hücre tipinin ayrı olarak çalışılması gerekmektedir. Hücrelerin bireysel olarak transkripsiyon aktivitesi ancak çok yüksek duyarlılık içeren yöntemler ile ortaya çıkarılmaktadır. "kantitatif-PZR" teknolojisinin son 5 yılda kullanımı muazzam bir şekilde artmıştır (Gunel ve Aydınli, 2009).

2.4.3.1. TaqMan Tekniği (Applied Biosystem)

TaqMan analizleri bir 5 'nükleaz analizine dayanır (Livak ve ark., 1995; Livak, 1999). PZR amplifikasyonunu ve genotiplemeyi tek bir reaksiyonda birleştirir. Bir allele spesifik bir şekilde verilen bir polimorfik sekansa hibridize olabilen iki prob, tek bir PZR reaksiyonuna eklenir. Her prob 5 'ucunda bir floresan raportör ve 3' ucunda bir boya

baskılayıcı taşır. Baskılayıcı molekülü, polimorfik lokusun amplifikasyonu sırasında bir prob, uygun SNP allele hibritlenene (birleşene) kadar rapörtörün floresanını baskılamaktadır. Baskılayıcı molekülü, Taq polimerazın 5 'nükleaz aktivitesi ile ayrıldığında, raportör molekül, baskılayıcı molekülünden serbest bırakılır ve bir floresan sinyali üretilir. Bu SNP'nin genotipi, tipik olarak amplifikasyonun sonunda, iki allele spesifik raportör boya için floresan sinyali karşılaştırılarak belirlenir (Engle ve ark., 2006).

Taqman prob sisteminde en yaygın kullanılan raportör boya FAM olmakla birlikte TET, JOE ve HEX gibi farklı boyalarda kullanılabilir. Baskılayıcı olarak VIC, TAMRA ve DABOCYL kullanılır (Temizkan ve Arda, 2017).

Taqman yönteminin en önemli avantajı hedef DNA'ya özgü problemlerle çalışıldığından işleyiş mekanizmasının duyarlı olmasıdır. TaqMan analizinin avantajlarından biri de, PZR amplifikasyonu ve genotipleme analizini tek bir aşamada birleştirip, örnek işlemeyi büyük ölçüde azaltabilmesidir. TaqMan genotipleme diğer genotipleme yaklaşımları ile karşılaştırıldığında maliyeti daha yüksektir. Fakat bu maliyet, test kurulumu ve uygulanması ile ilişkili daha az emek gerektirmesi ile telafi edilebilir. Ayrıca, TaqMan analizlerinin maliyeti diğer genotipleme maliyetlerinin yarısı ile üçte biri arasındadır ve genel genotipleme maliyetini belirlerken bu durum dikkate alınmalıdır (Engle ve ark., 2006).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Çalışma Grubu ve Kontrol Grubunun Seçilmesi

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteronoloji Anabilim Dalı'na gastroözofagiyal reflü ve yutkunma şikayetleri ile başvuran, uzman hekimler tarafından yapılan endoskopik incelemede özofagus kanser tanısı konulan ve patolojik inceleme ile bu tanının doğrulandığı hastalar çalışma grubuna alındı (n=69). Özofagus kanseri olan bu bireyler çalışma hakkında hazırlanan hasta bilgilendirme onam formu ve anket formu doldurularak venöz kan örnekleri alındı.

Kontrol grubu (n=101), hastaneye belli bir rahatsızlığı olduğu için başvurmuş fakat özofagus kanseri olmadığı belirlenen veya başka herhangi bir kanser türünün gözlenmediği, yaş, cinsiyet ve sigara içme alışkanlıkları sorularak yaş bakımından hasta grubu ile uyumlu olacak şekilde sağlıklı bireylerden oluşturuldu. Bu kişilere de hazırlanan hasta bilgilendirme onam formu ve anket formu dolduruldu ve venöz kan örnekleri alındı.

Çalışmada değerlendirilecek parametrelerin tespiti amacıyla, yaş, cinsiyet, ağırlık-boy, sigara ve alkol tüketimi, beslenme alışkanlığı, ailede kanser olup olmadığı, tandır dumanına maruz alıp kalmadığı gibi soruları içeren anket formu çalışmaya katılan tüm bireylere uygulandı. Bu anket formunun bir örneği ekte sunulmuştur.

Çalışmamızda yaptığımız bütün deneyler, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında yapıldı.

3.2. Çalışma ve Kontrol Grubundan Biyolojik Materyalin Toplanması

Çalışmamızda, biyolojik materyal olarak, çalışma ve kontrol grubuna alınan bireylerin periferik kan örnekleri EDTA'lı kan tüplerinde toplandı. EDTA'lı tüplerdeki kan örneklerinden DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Örnekler DNA izolasyonu yapılabildiği kadar -20 °C'de saklandı.

3.3. Kullanılan Kimyasalar

Ethanol Sigma Aldrich (Kat No:32205 USA)
Tagman Genotyping Master Mix (Kat No:4371355 USA)
Tagman Genotyping SNPAssay kit rs1059234 (Kat No:4351379 USA)
Tagman Genotyping SNPAssay kit rs1801270 (Kat No:4351379 USA)
Tagman Genotyping SNPAssay kit rs3176352 (Kat No:4351379 USA)

3.4. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

Soğutmalı santrifüj (Hitachi Tokyo, JAPONYA)
Nano drop (Thermo scientific USA)
Reel Time PCR (Applied Biosystem Step One Plus USA)
96 Fast well plate (Applied biosystem USA)
Optical Adhesive covers (Applied biosystem, 4360954 USA)
Otoklav (Nüve)
Mikropipetter (Thermo scientific USA)
Isıtıcı tabla (Biosan Dry thermostat Danimarka)
Vorteks (Wisemix Wellington, Yeni Zelanda)
Buz dolabı ve derin dondurucu (Siemens Berlin, Almanya)

3.5. DNA İzolasyonu

Kan materyalleri İnvitrogen Purelink Genomics DNA Mini Kit (kat no=K1820)
DNA izolasyon kiti ile aşağıdaki protokole göre izole edildi;

- 1) -20 °C'de sakladığımız kan örneklerini çıkarıp oda sıcaklığında çözümleri beklendi Isıtıcı tabla (Biosan) 55 °C ye ayarlandı.
- 2) Herbir kan örneğinden 200 µl alınarak 1,5 ml'lik steril ependorf tüplere aktarıldı.
- 3) Üzerine önce 20 µl Proteinase K, daha sonra 20 µl RNase A ekleyip iyice vorteksledikten sonra 2 dk inkübasyona bırakıldı.
- 4) Daha sonra üzerine 200 µl liziz bağlanma tamponu eklendi, iyice vorteksledikten sonra 55 °C'de 10 dk inkübasyona bırakıldı.

- 5) İnkübasyondan sonra üzerine 200 µl %100 absolute ethanol eklenip vortekslendi.
- 6) Örnekleri spin kolana aktarıp 10.000 g'de 1 dakika santrifüj yapıldı ve sonra toplama tüpü atılarak, spin kolon yeni toplama tüpüne takıldı.
- 7) Spin kolana 500 µl yıkama tamponu 1 eklendi, 10.000 g'de 1 dakika santrifüj yapıldı toplama tüpü atıldı ve yeni toplama tüpüne aktarıldı.
- 8) Spin kolona 500 µl yıkama tamponu 2 eklenip, maximum hızda 3 dakika santrifüj yapıldı toplama tüpü atılarak spin kolon yeni 1,5 ml'lik steril ependorf tüpün içine alındı.
- 9) Spin kolona önce 30 µl elüsyon tamponu eklendi 1 dk beklendi ve max. hızda 1 dk santrifüj edildi, daha sonra üzerine tekrar 50 µl elüsyon tamponu eklendi 3 dk beklendi ve max. hızda 1 dk santrifüj yapılarak Nanodrop'ta ölçüm yapıldı.

3.6. DNA Miktar ve Saflığının Ölçülmesi

DNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflığı Nanodrop (Thermo scientific) ile ölçüldü. DNA'nın konsantrasyonu 260 nm'de optik yoğunluğu(OD), saflığı ise 260 nm/280 nm'deki OD'sinden belirlendi. DNA 260 nm/280 nm de ki OD'leri 1,6 - 1,8 aralığında ise saf olarak kabul edildi. Bu aralıkta saflık değerleri ölçülen örneklerin tüpleri parafinlenerek -20 °C ye kaldırıldı.

3.7. Genotipleme

3.7.1. Gerçek Zamanlı PZR (Kantitatif PZR)

Bunun için hasta ve kontrol grubundan izole ettiğimiz ve -20 °C'de tuttuğumuz DNA'lar çıkarılarak buz üzerine alındı ve çözünmesi beklendi. Genotipleme için kullanılacak DNA miktarının tüm örnek tüplerinden aynı oranda alınabilmesi için bütün örnekler 10 ng/µl olacak şekilde sulandırıldı.

Daha sonra Tagman genotyping master mix ve SNP Assay kitleri vortekslenip kısa bir santrifüjden sonra, dondurma çözündürme işlemlerini en aza indirmek amacıyla alikotlama yapıldı. DNase –Rnase free sular içinde alikotlama işlemi yapıldı. Daha sonra her örnek için önce reaksiyon karışımı hazırlandı (Tablo 1).

Tablo 1. Bir örnek için kantitatif-PZR reaksiyon karışım içeriği

Bileşen	Reaksiyon tüpündeki konsantrasyon
DNase –Rnase free water	3,75 µl
Tagman SNP Assay Kit 40X	0,25 µl
Tagman Genotyping Master Mix 2X	5 µl
Genomik DNA	1 µl
Total hacim	10 µl

Örnek sayısı kadar reaksiyon karışımı hazırlandı. Karışıma DNA eklenmedi ve karışım tüpü kısa vortekslenip kısa bir santrifüj yapıldı. Daha sonra her bir plate kuyusuna 9 µl eklendi. Kit protokolüne son hacimin 10 µl olması yeterli olduğundan, her bir örnekten 1 µl DNA kuyulara eklendi. Kuyuların içinde hava kabarcığı olmamasına dikkat edildi. Plate, optical adhesive film ile kapatıldı ve gerçek zamanlı PZR cihazına yerleştirildi. Bilgisayar üzerinde cihaz ayarlamaları (reaksiyon hacmi, çalıştırma modu gibi) yapıldı. Sıcaklık değerleri aşağıdaki gibi ayarlandı (Tablo 2)

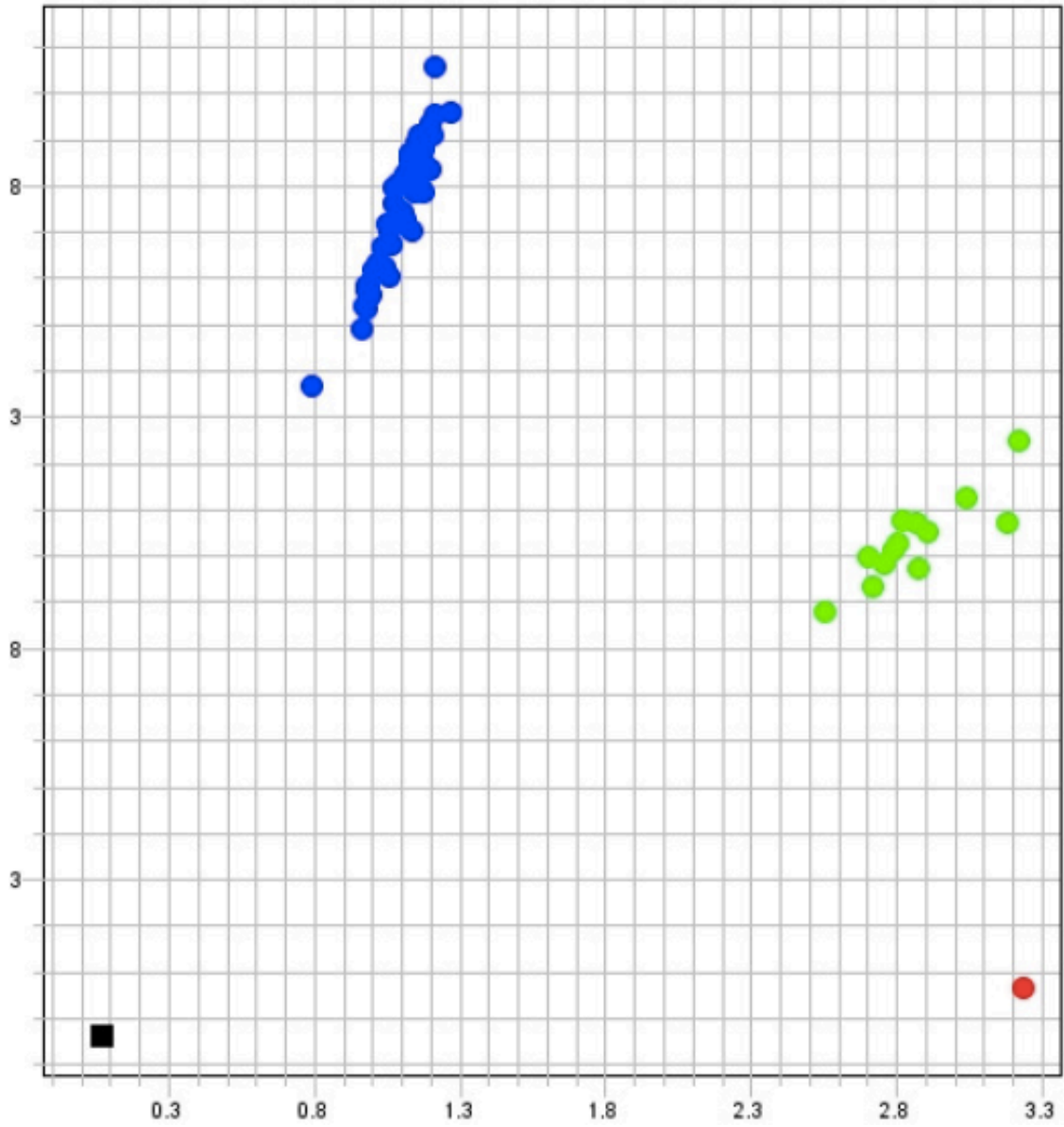
Tablo 2. Kantitatif-PZR sıcaklık değerleri

	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü
Polimeraz Aktivasyon	95	10 dk	-
Denatürasyon	95	15 sn	40
Birleşme /Uzama	60	1 dk	

Sn; saniye, dk; dakika

Sıcaklık ayarlaması yapıp, tüm kontroller yapıldıktan sonra cihaz çalıştırıldı.

p21 gen polimorfizmlerinin kantitatif-PZR sonuçları Şekil. 14'te gösterildiği gibi sonuçlandı.



Şekil 14. *p21* gen polimorfizmleri allel dağılımları. Kırmızı; Homozigot allel 1'igösteriyor (VIC), Mavi; Homozigot allel 2'yi gösteriyor (FAM), Yeşil; Heterizigot olduğunu gösteriyor, Siyah; Blank.

Her bir SNP için alınan genotipleme kitinde verilen VIC/FAM allellere göre yabancı tip, mutant tip veya heterozigot olup olmadığı değerlendirildi.

3.8. İstatistiksel Analiz

Çalışmanın istatistiksel analizleri SPSS 15.0 paket programı kullanılarak değerlendirildi. Sosyodemografik özelliklerin gruplar arasındaki farklılıklarının

belirlenmesinde Ki-kare ve/veya Fisher Exact test sonuçları kullanıldı, yine kategorik değişkenler arasındaki dağılımların test edilmesi amacıyla ki-kare ve Fisher'in exact testlerinden yararlandı. Sonuçlar tablolarda frekans dağılımları ve yüzdeler olarak ifade edildi, istatistiksel anlamlılık sınırı $p < 0.05$ olarak alındı.



4. BULGULAR

4.1. Demografik Bulgular

Yaptığımız çalışmaya katılan hasta ve kontrol grubuna, ekte sunulan anket formundaki (Tablo 3) sorulara vermiş oldukları cevaplara göre cinsiyet, yaş ve ailede kanser gibi demografik özellikler açısından ve bu hastalık için risk faktörü oluşturduğu söylenen sigara ve alkol kullanımı, sıcak çay tüketimi, Van otlu peyniri tüketimi, meyve tüketimi, tandır dumanına maruz kalma (sadece kadınlar için), reflü hastalığı ve beslenme şekli açısından değerlendirildi. Değerlendirilen bu özelliklerden ailesel kanser, sigara kullanımı, otlu peynir tüketimi, tandır dumanına maruz kalma (sadece kadınlar için), reflü hastalığı, hasta grubunda kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu gözlemlendi ($p<0,05$). Diğer özellikler için gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamadı ($p>0,05$) (Tablo 3).

Tablo 3. Özofagus kanseri ve kontrol grubunun demografik özelliklerinin karşılaştırılması.

Değişkenler	Özofagus Kanseri n=69 (n/%)	Kontrol grubu n=101 (n/%)	P değeri
Cinsiyet			
Erkek	31 (44,9)	46 (45,5)	1
Kadın	38 (55,1)	55(54,5)	
Yaş			
<55	25 (36,2)	73 (72,3)	p<0,001
<=55	44 (63,8)	28(27,7)	
Sigara Kullanımı			
Var	30 (44,8)	28 (27,7)	0,031
Yok	37 (55,2)	73 (72,3)	
Bilinmeyen	2		
Alkol Kullanımı			
Var	3 (4,2)	3 (3)	*0,684
Yok	64 (95,8)	98 (97)	
Bilinmeyen	2		

Tablo 2'nin devamı sonraki sayfada

Değişkenler	Özofagus Kanseri n=69 (n/%)	Kontrol grubu n=101 (n/%)	P değeri
Sıcak Çay Tüketimi			
Var	57 (85,1)	77 (76,2)	0,176
Yok	10 (14,9)	24 (23,8)	
Bilinmeyen	2		
Otlu Peynir Tüketimi			
Var	58 (86,6)	71 (70,3)	0,016
Yok	9 (13,4)	31 (29,7)	
Bilinmeyen	2		
Meyve Tüketimi			
Var	46 (68,7)	71 (70,3)	0,865
Yok	21 (31,3)	31 (29,7)	
Bilinmeyen	2		
Tandır Dumanına Maruz Kalma (sadece Kadınlar için)			
Var	31 (83,8)	13 (23,6)	p<0,001
Yok	6 (16,2)	42 (76,4)	
Bilinmeyen	1		
Reflü			
Var	28 (41,8)	14 (13,9)	p<0,001
Yok	39 (58,2,2)	87 (86,1)	
Bilinmeyen	2		
Histopatolojik durum			
SCC	51(77,3)		
ADC	15(22,7)		
Bilinmeyen	3		
Ailede Kanser			
Var	38 (55,9)	24 (23,8)	p<0,001
Yok	29 (44,1)	77 (76,2)	
Bilinmeyen	2		
Beslenme Şekli			
Sebze	16 (24,2)	28 (27,7)	*0,020
Et	12 (18,2)	34 (33,7)	
Sebze+Et	37 (56,1)	34 (33,7)	
Diğer	1 (1,5)	5 (5)	

Anlamlılık düzeyi : p<0,05, *= Fisher Exact testi sonucu, diğer ki- kare testi.

4.2. SNP Analizleri

4.2.1 Genotip Frekansları

Özofagus kanseri tanılı 69 hasta ve 101 kontrol grubu arasında *p21* polimorfizmleri açısından istatistiksel anlamlılık değerlendirilmesi yapıldı. Hasta ve kontrol grubu kanlarından izole edilen DNA'lar gerçek zamanlı PZR cihazında Taqman assay yöntemi ile genotipleme çalışmasından sonra 3 tane SNP 'nin *p21* genindeki genotip frekansları belirlendi (Tablo 4).

Hastalarda rs1059234 polimorfizmi genotipi, 51 (%73,9) homozigot yabanıl tip, 17 (%24,6) heterozigot ve 1 (%1,4) homozigot mutant tip olarak dağılım gösterdi. Aynı polimorfizmin kontrol grubunda dağılımı ise, 81 (%80,2) homozigot yabanıl tip, 19 (%18,8) heterozigot ve 1 (%1) homozigot mutant tip. Hasta ve kontrol grubu arasında genotip frekans dağılımı incelendiğinde bu polimorfizm için anlamlı bir farklılık görülmedi ($p=0,636$). Hasta grubunda C allelini homozigot taşıyanlar (T alleli taşımayanlar) %73,9 ve T allelini taşıyanlar %26,1 iken kontrol grubunda bu oranlar sırası ile %80,2 - %19,8 olarak belirlendi. Yabanıl tip alleli homozigot taşıyan ve T allelini taşıyanlar açısından hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık görülmedi ($p=0,354$; Tablo 4).

Hastalarda rs1801270 polimorfizmi genotipi, 53 (%76,8) homozigot yabanıl tip, 15 (%21,7) heterozigot ve 1 (%1,4) homozigot mutant tip olarak dağılım gösterdi. Aynı polimorfizmin kontrol grubunda dağılımı ise, 78 (%77,2) homozigot yabanıl tip, 22 (%21,8) heterozigot ve 1 (%1) homozigot mutant tip. Hasta ve kontrol grubu arasında genotip frekans dağılımı incelendiğinde bu polimorfizm için de anlamlı bir farklılık görülmedi ($p=1$). Hasta grubunda C allelini homozigot taşıyanlar (A allelini taşımayanlar) %76,8 ve A allelini taşıyanlar %23,2 iken kontrol grubunda bu oranlar sırası ile %78,2 - %21,8 olarak belirlendi. Yabanıl tip alleli homozigot taşıyan ve A allelini taşıyanlar açısından hasta ve kontrol grubu arasında yine anlamlı bir farklılık görülmedi ($p=0,853$; Tablo 4).

Hastalarda rs3176352 polimorfizmi genotipi, 25 (%36,2) homozigot yabanıl tip, 32 (%46,4) heterozigot ve 12 (%17,4) homozigot mutant tip olarak dağılım gösterdi. Aynı

polimorfizmin kontrol grubunda dağılımı ise, 42 (%41,6) homozigot yabancı tip, 45 (%44,6) heterozigot ve 14 (%13,9) homozigot mutant tip. Hasta ve kontrol grubu arasında genotip frekans dağılımı incelendiğinde bu polimorfizm için de anlamlı bir farklılık görülmedi ($p=0,636$). Hasta grubunda G allelini homozigot taşıyanlar (C allelini taşımayanlar) %17,4 ve C allelini taşıyanlar %82,6 iken kontrol grubunda bu oranlar sırası ile %13,9 - %86,1 olarak belirlendi. G alleli homozigot taşıyan ve C allelini taşıyanlar açısından hasta ve kontrol grubu arasında yine anlamlı bir farklılık görülmedi (Tablo 4).

Tablo 4. Özofagus kanserli hastalarda ve kontrol grubunda *p21* genotip frekansları

Genotip Frekansları				
SNP'ler	Genotip	Özofagus kanserli hasta, n (%)	Kontrol Grubu, n (%)	P değeri
rs1059234	CC	51 (73,9)	81 (80,2)	*0,626
	CT	17 (24,6)	19 (18,8)	
	TT	1 (1,4)	1 (1,0)	
	T Alleli taşıyanlar (TT,CT)	18 (26,1)	20 (19,8)	0,354
	T Alleli taşımayanlar (CC)	51 (73,9)	81 (80,2)	
rs1801270	CC	53 (76,8)	78 (77,2)	*1
	CA	15 (21,7)	22 (21,8)	
	AA	1 (1,4)	1 (1)	
	A Alleli taşıyanlar (AA,CA)	16 (23,2)	22 (21,8)	0,853
	A Alleli taşımayanlar (CC)	53 (76,8)	79 (78,2)	

(Tablo 4 'ün devamı diğer sayfada)

Genotip Frekansları				
SNP'ler	Genotip	Özofagus kanserli hasta, n (%)	Kontrol Grubu, n (%)	P değeri
rs3176352	GG	12 (17,4)	14 (13,9)	0,706
	GC	32 (46,4)	45 (44,6)	
	CC	25 (36,2)	42 (41,6)	
	C Alleli taşıyanlar (CC,GC)	57 (82,6)	87 (86,1)	0,801
C Alleli taşımayanlar (GG)	12 (17,4)	14 (13,9)		

Anlamlılık düzeyi: $p < 0,05$, *= Fisher Exact testi sonucu, diğer sonuçlar ki-kare testi.

4.2.2 Allel Frekansları

Hasta ve kontrol grubu kanlarından izole edilen DNA'lar Real Time PCR cihazında Taqman Assay yöntemi ile genotipleme çalışması yapılarak belirlediğimiz polimorfizmlerin allel frekansları istatistiksel analiz yapılarak belirlendi (Tablo5).

rs1059234 polimorfizminde hasta grubunda C allel frekansı %86,2 ve mutant allel frekansı %13,8 olup, kontrol grubunda C allel frekansı %89,6 ve mutant allel frekansı %10,4 olarak tespit edildi. Hasta ve kontrol grubu arasındaki mutant allel frekansı benzer gözlenmiş olup, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı anlaşıldı ($p=0,393$) (Tablo 5).

rs1801270 polimorfizminde hasta grubunda C allel frekansı %84,8 ve mutant allel frekansı %15,2 iken, kontrol grubunda C allel frekansı %88,1 ve mutant allel frekansı %11,9 olarak tespit edildi. Bu polimorfizmde de benzer şekilde hasta ve kontrol grubu arasındaki mutant allel frekansı benzer gözlenmiş olup, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı belirlendi ($p=0,416$) (Tablo 5).

rs3176352 polimorfizminde hasta grubunda C allel frekansı %59,4 ve mutant allel frekansı %40,6 olup, kontrol grubunda C allel frekansı %65,6 ve mutant allel frekansı

%34,4 olarak tespit edildi. Aynı şekilde bu polimorfizm için de allel frekanslarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı gözlemlendi ($p=0,258$) (Tablo 5).

Tablo 5. Özofagus kanserli hastalarda ve kontrol grubunda *p21* allel frekansları

Allel Frekansı				
SNP	Allel	Özofagus kanserli hasta n=69 (%)	Kontrol grubu n=101 (%)	p değeri
rs1059234	C Alleli	119 (86,2)	181 (89,6)	0,393
	T Alleli	19 (13,8)	21 (10,4)	
rs1801270	C Alleli	117 (84,8)	178 (88,1)	0,416
	A Alleli	21 (15,2)	24 (11,9)	
rs3176352	G Alleli	56 (40,6)	73 (34,4)	0,258
	C Alleli	82(59,4)	139(65,6)	

Anlamlılık düzeyi : $p<0,05$, *= Fisher Exact testi sonucu, diğerleri ki-kare testi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışma, *p21* polimorfizmlerinin (rs1059234, rs1801270, rs3176352) Türkiye'nin Doğu Anadolu bölgesindeki dağılımlarını belirlemek ve özofagus kanseri ile ilişkinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. *p21*, hücrel büyümenin durdurulmasında önemli rol oynayan bir siklin bağımlı kinaz inhibitörüdür. DNA hasarına cevaben *p21*, p53 geni tarafından indüklenir ve dolayısı ile de doğrudan p53-indüklü G1'in durmasına neden olur (Xiong ve ark., 1993; Powell ve ark., 2002). Bu gendeki değişiklikler hücrel çoğalmanın düzenlenmesini olumsuz yönde etkileyebilir ve kansere karşı duyarlılığı artırabilir (Wu ve ark., 2003(b)).

Daha önce yapılan çalışmalarda, *p21* rs1059234 varyantının fonksiyonel rolü henüz iyi bir şekilde yorumlanamamıştır, birçok yayınlanmış klinik çalışmada örneğin Amerika'nın Texas eyaleti bölgesinde yapılan baş ve boyun bölgesindeki sküamoz hücreli karsinom hücreleri ile yapılan çalışmada TT genotip frekansı %1,2 (p=0,02) ve T allel frekansı %14 (p=0,005) olduğu görülmüş, bu varyantın kanser ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Li ve ark., 2005; Lei ve ark., 2010; Liu ve ark., 2013(a)). Diğer taraftan, yayınlanan bazı klinik çalışmalar da, Çin popülasyonunda özofagus kanserli hastalarla yapılan çalışmada TT genotip oranı %17(p=0,086) ve T allel frekansı oranı ise %68 p=0,311 olduğu görülmüş bu varyantın kanser riski ile ilgili olmadığı ifade edilmiştir. (Wu ve ark., 2006; Zheng ve ark., 2014; Yin ve ark., 2015). Birbirine zıt sonuçların bildirilmesi nedeniyle henüz bu polimorfizmin özofagus kanseri ile ilişkisi netleşmemiştir. Ayrıca Türk popülasyonunda özofagus kanserinde bu polimorfizm ile ilgili bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bizim çalışmamızda da bu varyantın özofagus kanser gelişimi ile bir ilişkisi bulunamamıştır. Bu varyanttaki homozigot mutant T allel frekansı hastalarda (%13,8), kontrol grubundan (%10,4) daha yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır (p>0,05).

p21 rs1801270 varyantında ise yapılan çalışmaların bazı klinik çalışmalarda, Çin popülasyonunda serviks kanserli hastalarda yapılan çalışmada AA genotip oranının %16,3 (p=0,005) ve A allel frekansının oranı %42,1 (p=0,003) olduğu görülmüş ve bu durumun serviks kanseri ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Jiang ve ark., 2010). Diğer taraftan Çin'de özofagus kanserli hastalarla yapılan başka bir çalışmada AA genotip oranı %18 (p=0,097) ve A allel frekansı oranı ise %69 (p=0,092) olduğu görülmüş ve bu

durumun özofagus kanseri ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (Zheng ve ark., 2014; Taghavi ve ark., 2010). Bizim çalışmamızda da bu varyantın özofagus kanseri ile ilişkisi bulunamamıştır. Bu varyanttaki homozigot mutant A allel frekansı hastalarda (%15,2), kontrol grubundan (%11,9) daha yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

p21 rs3176352 varyantında ise Çin popülasyonunda özofagus kanserli hastalarla yapılan bir çalışmada, CC genotip oranı %29 ($p=0,0026$) ve C allel frekansı oranı ise %65 ($p=0,0009$) olduğu görülmüş ve bu polimorfizmin özofagus kanseri ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (Zhang ve ark., 2014). Fakat bizim çalışmamızda zıt olarak bu varyantın Türkiye'nin Doğu Anadolu popülasyonunda özofagus kanser gelişimi ile bir ilişkisi bulunamamıştır. SNP minör allel frekansı araması yapıldığında C alleli minör allel olarak verilmektedir, ancak popülasyonlar arasında bakıldığında en sık olarak gözlenen allelin değişkenlik gösterdiği görülmektedir. Bu varyanttaki homozigot haldeki C allel frekansı hastalarda (%59,4), kontrol grubundan (%65,6) daha yüksek olmasına rağmen yine istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Özofagus kanserinin birçok sebebi vardır. Kanser insidansını belirleyen etiyolojik faktörler tam olarak belirlenmemesine rağmen, bu tümörün karsinogenezinde genetik yatkınlığın ve diyet veya çevresel faktörlerin önemli olabileceği açıktır (Shen ve ark., 2002). Biz bu çalışmamızda özofagus kanserine oluşumuna risk oluşturan çevresel ve genetik etkiler üzerine çalıştık. Bunun için Türkiye'nin doğu bölgesinde yaşamakta olan özofagus kanserli hastalardan ve kontrol grubundan topladığımız kanlar ve hazırlamış olduğumuz anket soruları üzerinden bu çalışmamızı gerçekleştirdik.

Bazı coğrafik bölgelerde yapılan çalışmalarda özofagus kanserine yakalanan erkek hasta sayısı fazlayken, bazı bölgelerde kadın ve erkek sayısı eşittir. Türkiye' de ise Doğu Anadolu Bölgesinde son zamanlarda yapılan çalışmalarda özofagus kanserine yakalanan kadınların sayısının erkeklerden daha fazla olduğu bildirilmiştir (Eroglu ve ark., 2016). Bizim çalışmamızda da hasta olan kadın sayısının (%55,1) erkek sayısından (%44,9) daha fazla olduğu görülmektedir.

Özofagus kanserine yakalanma yaş oranı da bölgeden bölgeye farklılık gösterebilmektedir. Zheng L. ve ark. Çin'de yapmış olduğu bir çalışmada ortalama yaş

63 çıkmışken (Zheng ve ark., 2014), İran'da yapılan bir çalışmada ortalama yaş 60 çıkmıştır (Taghavi ve ark., 2010). Bizim çalışmamızda ise ortalama yaş 55 çıkmıştır.

Tütün kullanımı özofagusun kanseri için güçlü ve teyid edilmiş bir risk faktörüdür (Lundell, 2010). Bizim çalışmamızda da hasta ve kontrol grupları arasında sigara kullanımı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark ortaya çıkmıştır ($p<0,031$). Bu sonuçlara göre sigara kullanımının özofagus kanser riskini arttırdığı bu çalışma ile de belirlenmiştir.

Doğu Anadolu Bölgesi'nde bu hastalığın görülmesindeki sebeplerden biri olarak otlu peynir tüketimi gösterilmektedir (Turkdogan ve ark., 1996). Bunun sebebi ise otlu peynirin içinde bulunan otlardan kaynaklı nitrit ve nitrat oranının yüksek olmasıdır. Bu bileşiklerin direkt olarak vücuda alınması vücutta karsinojenik etki yapabilmektedir (Servi, 1993). Bizim çalışmamızda da hasta ve kontrol grupları kıyaslandığında otlu peynir tüketimi bakımından özofagus kanseri ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu anlaşılmıştır ($p=0,016$). Bu sonuçlara göre otlu peynir tüketiminin özofagus kanser riskini arttırabileceği anlaşılmaktadır.

Van'da yapılan bir çalışmada akciğer kanserinin kadınlarda daha yüksek olduğunu ve bunun nedeninin de tandırda ekmek yapmalarından dolayı olduğu açıklanmıştır (Gunbatar H ve ark., 2012). Türkiye'nin Doğu Anadolu Bölgesinde tandırda ekmek pişirme kadınlar tarafından yaygın olarak yapılır. Van'da daha önce yapılan bir çalışmada, ESCC'nin kadınlarda daha fazla görülmesinin nedeni olarak tandır dumanı gösterilmiştir (Poyrazoglu ve ark., 2017). Bu tandırlardan çıkan dumanın özofagus karsinogenezini indüklediği mekanizmalar belirsiz kalmaktadır, ancak daha önceki çalışmalar bu tandırlardan çıkan dumanın sigara dumanına benzer bir rol oynayabileceğini ileri sürmektedir (Turkdogan ve ark., 2005). Bizim çalışmamızda hasta ve kontrol gruplarındaki kadınlar arasında tandır dumanına maruz kalma bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu gözlemlendi ($p<0,001$). Bu sonuçlara göre tandır dumanına maruz kalma özofagus kanser riskini arttırmaktadır.

En güçlü ve en iyi karakterize özofagus kanser riski gastroözofageal reflüdür (Lagergen ve Lagergen, 2013). Bizim çalışmamızda da hasta ve kontrol grupları arasında

reflü bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu ortaya çıkmıştır ($p<0,001$). Bu sonuçlara göre reflü özofagus kanser riskini artırmaktadır.

Türkiye’de Doğu Anadolu Bölgesinde özofagus kanseri ile ilgili yapılan son çalışmalarda histopatolojik durum SCC drumunun ADC durumundan daha yaygın olarak görüldüğü söylenmiştir (Eroglu ve ark., 2016). Bizim çalışmamızda uyumlu olarak SCC durumunun (%77,3) ile ADC durumundan (%22,7) daha yaygın olduğu belirlenmiştir.

Ailesel yatkınlık özofagus kanser riskini artıran diğer bir nedendir. Çalışmamızda da hasta ve kontrol grupları arasında ailede kanser görülme bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark ortaya çıkmıştır ($p<0,001$). Bu sonuçlara göre ailesel yatkınlık özofagus kanser riskini artırmaktadır.

Doymuş yağ ve kolesterol oranının fazla olduğu yiyecekler özofagus adenokanser riskini artırırken bitkisel gıdalar (Lifi vitamin C, b-karoten ve folat) bu riski azaltırlar (Lagergren, 2006). Fazla miktarda karbonhidrat alımıyla artmış özofagus adenokarsinomu arasında güçlü bir ilişki bulunmuştur (Mao ve ark., 2011). Yüksek miktarda kırmızı et tüketimi de risk faktörü olarak gösterilmektedir (Huang ve ark., 2016.). Çalışmamızda da hasta ve kontrol grupları arasında beslenme şekilleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu ortaya çıkmıştır ($p<0,020$). Bu sonuçlara göre beslenme şekli özofagus kanser yakalanma riskini etkilemektedir.

Bunun dışında, özofagus kanser riskini arttırdığı belirtilen alkol kullanımı, meyve tüketimi ve sıcak çay tüketimi ile ilgili olarak bizim çalışmamızda hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkı olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$). Bu özellikler ile ilgili verilen yanıtların tam olarak doğru verilmediği ve bu nedenle diğer çalışmalardan farklı çıkmış olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışma Türkiye’nin doğu bölgesinde (Van ve çevresi) özofagus kanser gelişimi ile *p21* gen polimorfizmleri arasındaki ilişkiyi inceleyen ilk çalışmadır. Fakat baktığımız üç polimorfizmin de özofagus kanseri ile ilişkili olmadığı anlaşılmıştır.

Sonuç olarak, Türkiye’nin doğu bölgesinde *p21* polimorfizmleri (rs1059234, rs1801270, rs3176352) ve özofagus kanseri arasında bir ilişki olmadığı belirlenmiştir. Fakat bununla ilgili daha fazla araştırma yapılmasının bu verilerin doğruluğu açısından

daha iyi olacağı anlaşılmaktadır. Hastalığın gelişmesinde histopatolojik durum ve demografik özellikler ile bu polimorfizmler arasında da herhangi bir ilişki tespit edilememiştir. Bunlar dışında daha önceki çalışmalar ile uyumlu olarak çevresel etkenlerin bu kanser türünün gelişimine katkıda bulunduğu görülmektedir. Bu ön çalışma, Türkiye'nin doğusunda özafagus kanser riskinin *p21* polimorfizmlerine ilişkin ilk raporu olduğundan, daha geniş örnek büyüklükleri ve çeşitli Türk etnik popülasyonlardaki modifiye tasarımlara yönelik daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.



KAYNAKLAR

- Aachmann FL, Fomenko DE, Soragni A, Gladyshev VN, Dikiy A. Solution structure of selenoprotein W and NMR analysis of its interaction with 14-3-3 proteins. *J Biol Chem*. 2007;282 (51):37036–44.
- Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer* 2009;9 (6):400–14.
- Agrawal N, Jiao Y, Bettgowda C, Hutfless SM, Wang Y, David S, Cheng Y et al. Comparative genomic analysis of esophageal adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Cancer Discov* 2012; 2:899–905.
- Alcolea MP, Jones PH. Cell competition: winning out by losing notch. *Cell Cycle* 2015;14:9–17.
- Badano JL, Katsanis N. Beyond Mendel: an evolving view of human genetic disease transmission. *Nat Rev Genet* 2002;3:779–89.
- Bahl R, Arora S, Nath N, Mathur M, Shukla NK, Ralhan R. Novel polymorphism in p21(waf1/cip1) cyclin dependent kinase inhibitor gene: association with human esophageal cancer. *Oncogene* 2000;19:323-28.
- Bard-Chapeau EA, Jeyakani J, Kok CH, Muller J, Chua BQ, Gunaratne J, et al. Ecotopic viral integration site 1 (EV1) regulates multiple cellular processes important for cancer and is a synergistic partner for FOS protein in invasive tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109(6):2168–73.
- Baytop T. Türkçe Bitki Adları Sözlüğü, Atatürk Kültür, Dil ve Tarih Yüksek Kurumu Türk Dil Kurumu Yayınları: 578, Türk Tarih Kurumu Basım Evi. Ankara, 1994.
- Bitomsky N, Conrad E, Moritz C, Polonio-Vallon T, Sombroek D, Schultheiss K, et al. Autophosphorylation and Pin1 binding coordinate DNA damage-induced HIPK2 activation and cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110 (45): E4203–12.
- Blagosklonny MV. Are p27 and p21 cytoplasmic oncoproteins? *Cell Cycle* 2002;1(6):391–93.
- Bosetti C, Gallus S, Garavello W, La Vecchia C. Smoking cessation and the risk of oesophageal cancer: an overview of published studies. *Oral Oncol* 2006; 42: 957–64.
- Botstein D, Risch N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat Genet* 2003;33(Suppl): 228–37.
- Buas MF, He Q, Johnson LG, Onstad L, Levine DM, Thrift AP et al. Germline variation in inflammation-related pathways and risk of Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma. *Gut*. 2017;66(10): 1739-47.
- Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, Sedivy JM, Kinzler KW, Vogelstein B. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 1998;282:1497-1501.

- Cargill M, Altshuler D, Ireland J, Sklar P, Ardlie K, Patil N et al. Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet* 1999;22: 231–38.
- Carlini LE, Meropol NJ, Bever J, Andria ML, Hill T, Gold P et al. UGT1A7 and UGT1A9 polymorphisms predict response and toxicity in colorectal cancer patients treated with capecitabine/irinotecan. *Clin Cancer Res*. 2005;11:1226–36.
- Cazier JB, Rao SR, McLean CM, Walker AK, Wright BJ, Jaeger EE, et al. Whole-genome sequencing of bladder cancers reveals somatic CDKN1A mutations and clinicopathological associations with mutation burden. *Nat Commun* 2014; 5:3756.
- Cazzalini O, Donà F, Savio M, Tillhon M, Maccario C, Perucca P, et al. p21CDKN1A participates in base excision repair by regulating the activity of poly(ADP-ribose) polymerase-1. *DNA Repair Amst*. 2010;9(6):627–35.
- Chang CL, Lao-Sirieix P, Save V, Mendez G, Laskey R, Fitzgerald RC. Retinoic acid-induced glandular differentiation of the oesophagus. *Gut* 2007;56:906–17.
- Chen J, Saha P, Kornbluth S, Dynlacht BD, Dutta A. Cyclin binding motifs are essential for the function of p21CIP1. *Mol Cell Biol*. 1996;16(9):4673–82.
- Chen Y, Tong Y, Yang C, Gan Y, Sun H, Bi H, et al. Consumption of hot beverages and foods and the risk of esophageal cancer: a meta-analysis of observational studies. *BMC Cancer* 2015;15:449-62.
- Cheng X, Xia W, Yang JY, Hsu JL, Chou CK, Sun HL, et al. Activation of p21(CIP1/WAF1) in mammary epithelium accelerates mammary tumorigenesis and promotes lung metastasis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;403:103-10.
- Choi WI, Kim MY, Jeon BN, Koh DI, Yun CO, Li Y, et al. Role of promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) in cell proliferation and cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21WAF/CDKN1A) gene repression. *J Biol Chem*. 2014;289 (27):18625–40.
- Cmielová J, Rezáčková M. p21Cip1/Waf1 protein and its function based on a subcellular localization. *J Cell Biochem*. 2011;112(12):3502–06.
- De la Cueva E, García-Cao I, Herranz M, López P, García-Palencia P, Flores JM, et al. Tumorigenic activity of p21Waf1/Cip1 in thymic lymphoma. *Oncogene*. 2006; 25: 4128-32.
- Desai TK, Krishnan K, Samala N, Singh J, Cluley J, Perla S, et al. The incidence of oesophageal adenocarcinoma in non-dysplastic Barrett's oesophagus: a meta-analysis. *Gut*. 2012 61:970–76.
- di Pietro M, Alzoubaidi D, Fitzgerald RC. Barrett's esophagus and cancer risk: how research advances can impact clinical practice. *Gut Liver* 2014;8:356–70.
- di Pietro M, Fitzgerald RC. Research advances in esophageal diseases: bench to bedside. *F1000Prime Rep*. 2013;5:44.
- Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Butel JS, et al. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 1992; 356: 215-21.

- Duttu H, Tillhon M, Cazzalini O, Stivala LA, Presperi E. Biology of the cell cycle inhibitor p21^{CDKN1A}: molecular mechanisms and relevance in chemical toxicology. *Arch Toxicol* 2015;89: 155-78.
- Engle LJ, Simpson CL, Landers JE. Using high-throughput SNP Technologies to study cancer. *Oncogene* 2006;25:1594-1601.
- Ek WE, Lagergren K, Cook M, Wu AH, Apnet CC, Levine D, et al. Polymorphisms in genes in the androgen pathway and risk of Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2016; 138: 1146–52.
- Eroglu A, Aydın Y, Altundas B, Gündoğdu B, Yılmaz Ö. The increasing incidence of esophageal squamous cell carcinoma in women in Turkey. *Turk J Med Sci.* 2016;46:1443-48.
- Ferguson MK, Skinner DB. Carcinoma of the esophagus and cardia. Ed: Orringer MB. *Surgery of the Alimentary Tract.* W B Saunders Company. 1991;246-74.
- Fitzgerald RC. Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma: how does acid interfere with cell proliferation and differentiation? *Gut.* 2005;54(Suppl 1):i21–i26.
- Fotadar R, Fitzgerald P, Rousselle T, Cannella D, Dorée M, Messier H, et al. p21 contains independent binding sites for cyclin and cdk2: both sites are required to inhibit cdk2 kinase activity. *Oncogene.* 1996;12(10):2155–64
- Gartel AL, Tyner AL. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther.* 2002;1:639-49.
- Gartel AL. Is p21 an oncogene? *Mol Cancer Ther.* 2006;5 (6):1385–86.
- Genecards CDKN1A [Internet]. 2015 [Erişim tarihi:31 Temmuz 2018]. Erişim adresi: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CDKN1A>.
- Gharahkhani P, Fitzgerald RC, Vaughan TL, Palles C, Gockel I, Tomlinson I, et al. Genome-wide association studies in oesophageal adenocarcinoma and Barrett's oesophagus: a large-scale meta analysis. *Lancet Oncol.* 2016;17:1363–73.
- Goetsch E. The structure of the mammalian esophagus. *Am J Anat.* 1910;10:1–39.
- Goubin F, Ducommun B. Identification of binding domains on the p21Cip1 cyclin-dependent kinase inhibitor. *Oncogene.* 1995;10(12):2281–89.
- Graziano F, Kawakami K, Ruzzo A, Watanabe G, Santini D, Pizzagalli F, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase 677C/T gene polymorphism, gastric cancer susceptibility and genomic DNA hypomethylation in an at risk Italian population. *Int J Cancer* 2006;118: 628–32.
- Gunbatar H, Sertogullarından B, Özbay B, Sunnetcioglu A, Ekin S. Akciğer kanserli olguların değerlendirilmesi; 3 yıllık analiz. *Van Tıp Dergisi* 2012;19:13-20.
- Gunel T, Aydinli K. Real- Time PCR ve Uygulama Alanları. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 2009;2(2):43-45.
- Hatfield DL, Tsuji PA, Carlson BA, Gladyshev BN. Selenium and selenocysteine: roles in cancer, health, and development. *Trends Biochem Sci.* 2014;39(3):112-20.
- Hawkes WC, Wang TT, Alkan Z, Richter BD, Dawson K. Selenoprotein W modulates control of cell cycle entry, *Biol. Trace Elem Res* 2009;131(3):229–44.

- Hu Z, Huo X, Lu D, Qian J, Zhou J, Chen Y et al. Functional polymorphisms of matrix metalloproteinase-9 are associated with risk of occurrence and metastasis of lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:5433–39.
- Huang J, Bashir M, Ianettoni MD. Carcinoma Of The Esophagus. *General Thoracic Surgery*. Eds.: Shields TW, Lo Cicero III J, Reed CE, Feins RH in. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia 2009;7:1984-2016.
- Hwang CY, Kim IY, Kwon KS. Cytoplasmic localization and ubiquitination of p21(Cip1) by reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;358(1):219–25.
- Hydbring P, Malumbres M, Sicinski P. Non-canonical functions of cell cycle cyclins and cyclin-dependent kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016;17(5):280-92.
- Jeong DW, Kim TS, Chung YW, Lee BJ, Kim LY. Selenoprotein W is a glutathione-dependent antioxidant in vivo. *FEBS Lett*. 2002;517(1):225–28.
- Jiang P, Liu J, Li W, Zeng X, Tang J. Role of p53 and p21 polymorphisms in the risk of cervical cancer among Chinese women. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2010;42:671–76.
- Jiang Q, Chen K, Ma X, Li Q, Yu W, Shu G et al. Diets, polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase, and the susceptibility of colon cancer and rectal cancer. *Cancer Detect Prev*. 2005;29:146–54.
- Jung YS, Qian Y, Chen X. Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity. *Cell Signal*. 2010;22 (7):1003–12.
- Karimian A, Ahmadi Y, Yousefi B. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA Repair*. 2016;42:63-71.
- Klein, D. Quantification using real-time PCR technology: Applications and limitations. *Trends Mol Med* 2002;8: 257–60.
- Kriwacki RW, Hengst L, Tennant L, Reed SI, Wright PE. Structural studies of p21Waf1/Cip1/Sdi1 in the free and Cdk2-bound state: conformational disorder mediates binding diversity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93(21):11504–09.
- Kubista M. Emerging real-time PCR applications. *Drug Discovery Word*. 2008;6:57-66.
- Lagergren J, Lagergren P. Recent developments in esophageal adenocarcinoma. *CA Cancer J Clin*. 2013;63:232–48.
- Lagergren J. Etiology and risk factors for oesophageal adenocarcinoma: possibilities for chemoprophylaxis? *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2006;20:803-12.
- Lagergren K, Ek WE, Levine D, Chow WH, Bernstein L, Gasson AG, et al. Polymorphisms in genes of relevance for oestrogen and oxytocin pathways and risk of Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma: a pooled analysis from the BEACON Consortium. *PLoS One*. 2015;10:e0138738.
- Lee EW, Lee MS, Camus S, Ghim J, Yang MR, Oh W, et al. Differential regulation of p53 and p21 by MKRN1 E3 ligase controls cell cycle arrest and apoptosis. *EMBO J*. 2009;28 (14):2100–13.
- Leedham SJ, Preston SL, McDonald SA, Elia G, Bhandari P, Poller D, et al. Individual crypt genetic heterogeneity and the origin of metaplastic glandular epithelium in human Barrett's oesophagus. *Gut* 2008;57:1041–48.

- Lei D, Sturgis EM, Liu Z, Zafereo ME, Wei Q, Li G. . Genetic polymorphisms of p21 and risk of second primary malignancy in patients with index squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis* 2010;31:222-27.
- Li G, Liu Z, Sturgis EM, SHI Q, Chamberlain RM, Spitz MR, et al. Genetic polymorphisms of p21 are associated with risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis*, 2005;26:1596-602.
- Lin EW, Karakasheva TA, Hicks PD, Bass AJ, Rustgi AK. The tumor microenvironment in esophageal cancer. *Oncogene* 2016;35:5337-49.
- Lin J, Reichner C, Wu X, Levine AJ. Analysis of wildtype and mutant p21WAF-1 gene activities. *Mol Cell Biol.* 1996;16(4):1786-93.
- Liu F, Wei YG, Luo LM, Wang WT, Yan LN, Wen TF et al. Genetic variants of p21 and p27 and hepatocellular cancer risk in a Chinese Han population: a case-control study. *Int J Cancer.* 2013;132:2056-64.
- Liu J, Wang J, Leng Y, Lv C. Intake of fruit and vegetables and risk of esophageal squamous cell carcinoma: a meta-analysis of observational studies. *Int J Cancer* 2013; 133: 473-85.
- Liu Y, Yeh N, Zhu XH, Leversha M, Cordon-Cardo C, Ghossein R, et al. Somatic cell type specific gene transfer reveals a tumor-promoting function for p21(Waf1/Cip1). *EMBO J.* 2007;26:4683-93.
- Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.* 1995;4:357-62.
- Livak KJ. Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genet Anal.* 1999;14:143-49.
- Lundell LR. Etiology And Risk Factors For Esophageal Carcinoma. *Dig Dis.* 2010;28:641-44.
- Mao WM, Zheng WH, Ling ZQ. Epidemiologic risk factors for esophageal cancer development. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2011;12:2461-66.
- Martín-Caballero J, Flores JM, García-Palencia P, Serrano M. Tumor susceptibility of p21(Waf1/Cip1)-deficient mice. *Cancer Res.* 2001;61:6234-38.
- McKenzie KE, Siva A, Maier S, Runnebaum IB, Seshadri R, Sukumar S. Altered WAF1 genes do not play a role in abnormal cell cycle regulation in breast cancers lacking p53 mutations. *Clin Cancer Res.* 1997;3:1669-73.
- Meng XM, Chung AC, Lan HY. Role of the TGF- β /BMP-7/Smad pathways in renal diseases. *Clin Sci.* 2013;124(4):243-54.
- Moldovan GL, Pfander B, Jentsch S. PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell.* 2007;129(4):665-79.
- Mullan P, Quinn J, Harkin D. The role of BRCA1 in transcriptional regulation and cell cycle control. *Oncogene.* 2006;25(43):5854-63.

- Naito M, Vongsa S, Tsukune N, Ohashi A, Takahashi T. Promyelocytic leukemia zinc finger mediates glucocorticoid-induced cell cycle arrest in the chondroprogenitor cell line ATDC5. *Mol Cell Endocrinol.* 2015;417:114–23.
- Napier KJ, Scheerer M, Misra S. Esophageal cancer: a review of epidemiology, pathogenesis, staging workup and treatment modalities. *World J Gastrointest Oncol.* 2014;6:112–20.
- National Cancer Institute .What is cancer ? [internet]. 2018. [Erişim tarihi 30 Temmuz 2018]. Erişim adresi: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>.
- Nayak KB, Kuila N, Mohapatra AD, Panda AK, Chakraborty S. EVI1 targets Np63 and upregulates the cyclin dependent kinase inhibitor p21 independent of p53 to delay cell cycle progression and cell proliferation in colon cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013;45(8):1568–76.
- Nita ME, Nagawa H, Tominaga O, Tsuno N, Hatano K, Kitayama J, et al. p21Waf1/Cip1 expression is a prognostic marker in curatively resected esophageal squamous cell carcinoma, but not p27Kip1, p53, or Rb. *Ann Surg Oncol.* 1999;6:481-88.
- Ohkoshi S, Yano M, Matsuda Y. Oncogenic role of p21 in hepatocarcinogenesis suggests a new treatment strategy. *World J Gastroenterol.* 2015;21(42):12150-56.
- Otterness D, Szumlanski C, Lennard L, Klemetsdal B, Aarbakke J, Park-Hah JO et al. Human thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: gene sequence polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther.* 1997;62:60–73.
- Ozcelik MF. Özofagus Kanseri: Tanı ve Cerrahi Tedavi[Bildirir]. Goksoy E, Uzunismail H, Editörler. *Gastrointestinal Sistem Hastalıkları Sempozyumu*; 11-12 Ocak 2001; İstanbul. İstanbul; İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Komisyonu; 2001. 241-51.
- Palazzo EI, Kellett MI, Cataisson C, Gormley AI, Bible PW, Pietroni V, et al. The homeoprotein DLX3 and tumor suppressor p53 co-regulate cell cycle progression and squamous tumor growth. *Oncogene* 2016;35(24):3114-24.
- Patiño-García A, Sotillo-Piñeiro E, Sierrasesúmaga-Ariznabarreta L. p21WAF1 mutation is not a predominant alteration in pediatric bone tumors. *Pediatr Res.* 1998;43:393-95.
- Pavlidis SC, Lecanda J, Daubriac J, Pandya UM, Gama P, Blank S, et al. TGF- activates APC through Cdh1 binding for Cks1 and Skp2 proteasomal destruction stabilizing p27 kip1 for normal endometrial growth. *Cell Cycle* 2016;15(7):931–47.
- Pennathur A, Gibson MK, Jobe BA, Luketich JD. Oesophageal carcinoma. *Lancet* 2013;381:400–12.
- Peters JH, DeMeester TR. Esophagus and diaphragmatic hernia. Ed: Schwartz SI, Shires TG, Spencer FC *Principles of Surgery.* 1999;7:1081-180.
- Powell BL, van Staveren LL, Roosken P, Grieu F, Berns EM, Lacopetta B. Associations between common polymorphisms in TP53 and p21WAF1/Cip1 and phenotypic features of breast cancer. *Carcinogenesis* 2002;23:311–15.
- Poyrazoglu OB, Dulger AC, Gulpepe BS. Helicobacter Pylori infection in patients with esophageal squamous cancer. *Clinics(Sao Paulo)* 2017;72(3):150-53.

- Prabhu A, Obi KO, Rubenstein JH. The synergistic effects of alcohol and tobacco consumption on the risk of esophageal squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol.* 2014;109:822–27.
- Prives C, Gottifredi V. The p21 and PCNA partnership: a new twist for a nold plot. *Cell Cycle* 2008;7 (24):3840–46.
- Prosperi E. The fellowship of the rings: distinct pools of proliferating cell nuclear antigen trimer at work. *FASEB J.* 2006;20(7):833–37.
- Qu X, Ben Q, Jiang Y. Consumption of red and processed meat and risk for esophageal squamous cell carcinoma based on a meta-analysis. *Ann Epidemiol.* 2013; 23:762–70.
- Raman M, Chen W, Cobb M. Differential regulation and properties of MAPKs, *Oncogene* 2007;26 (22):3100–12.
- Rodríguez-Vilarrupla A, Díaz C, Canela N, Rahn HP, Bachs O, Agell N. Identification of the nuclear localization signal of p21(cip1) and consequences of its mutation on cell proliferation. *FEBS Lett.* 2002;531(2):319–23.
- Russo AA, Jeffrey PD, Patten AK, Massagué J, Pavletich NP. Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature.* 1996;382(6589):325–31.
- Rustgi AK, El-Serag HB. Esophageal carcinoma. *N Engl J Med.* 2014;371:2499–509.
- Seoane J, Le HV, Shen L, Anderson SA, Massagué J. Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell.* 2004;117 (2):211–23.
- Servi K. Elazığ bölgesinde tüketime sunulan et ve süt ürünlerinde nitrat ve nitrit düzeylerinin belirlenmesi. *FÜ Sağlık Bil Derg.* 1993;7(1):101-16.
- Shao A, Zheng L, Chen S, Gu H, Jing H. p21, p53, TP53BP1 and p73 polymorphisms and the risk of gastric cardia adenocarcinoma in a Chinese population. *Biomarkers* 2015; 20(2):109-15.
- Shen KC, Heng H, Wang Y, Lu S, Liu G, Deng CX, et al. ATM and p21 cooperate to suppress aneuploidy and subsequent tumor development. *Cancer Res.* 2005;65:8747-53.
- Shen ZY, Hu SP, Lu LC, Tang CZ, Kuang ZS, Zhong SP, et al. Detection of human papillomavirus in esophageal carcinoma. *J Med Virol.* 2002;68:412–16.
- Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 1995;9:1149-63.
- Shiohara M, el-Deiry WS, Wada M, Nakamaki T, Takeuchi S, Yang R, et al. Absence of WAF1 mutations in a variety of human malignancies. *Blood* 1994; 84:3781-84.
- Soria G, Gottifredi V. PCNA-coupled p21 degradation after DNA damage: the exception that confirms the rule? *DNA Repair.* 2010;9(4):358–64.
- Spechler SJ, Souza RF. Barrett's esophagus. *N Engl J Med.* 2014;371:836–45.
- Stanulla M, Schaeffeler E, Flohr T, Cario G, Schrauder A, Zimmermann M et al. Thiopurine methyltransferase (TPMT) genotype and early treatment response to mercaptopurine in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Jama.* 2005;293: 1485–89.

- Taghavi N, Biramijamal F, Abbaszadegan MR, Khademi H, Sotoudeh M, Khoshbakht S. P21 (Waf1/Cip1) Gene Polymorphisms and Possible Interaction with Cigarette Smoking in Esophageal Squamous Cell Carcinoma in Northeastern Iran, A Preliminary Study. *Archives of Iranian Medicine* 2010;13(3):235-42.
- Temizkan G, Arda N. *Temel ve İleri Moleküler Biyoloji ve Yöntemleri*. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri;2017.
- Tetreault MP. Esophageal cancer: insights from mouse models. *Cancer Growth Metastasis* 2015;8:37–46.
- Thermo Fisher Scientific[Internet]. 2018 [Erişim Tarihi 30 Temmuz 2018]. Erişim adresi: <https://www.thermofisher.com/order/genomelibrary/details/genotyping/C296951210>.
- Turkdogan MK, Testereci H, Kahraman T, Tuncer I, Aİgün E, Yörük LH. Mide ve özefagus kanserlerinde serum ve dokuda A ve E vitamini düzeyleri. *Turk J Gastroenteroloji* 1996; 7:327-30.
- Turkdogan MK, Akman N, Tuncer I, Uygan I, Kösem M, Ozel S, et al. Epidemiological aspects of endemic upper gastrointestinal cancers in eastern Turkey. *Hepatogastroenterology* 2005;52(62):496-500.
- Turkyilmaz A, Eroglu A, Subasi M, Karaoglanoglu N. Clinicopathological features and prognosis of esophageal cancer in young patients. Is there a difference in outcome? *Dis Esophagus*. 2009; 22: 211-15.
- Wang N, Wang S, Zhang Q, Lu Y, Wei H, Zhang S, et al. Association of p21 SNPs and risk of cervical cancer among Chinese women. *BMC Cancer*. 2012;12;589.
- Wang YA, Elson A, Leder P. Loss of p21 increases sensitivity to ionizing radiation and delays the onset of lymphoma in atm-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94: 14590-95.
- Warbrick E. PCNA binding through a conserved motif. *BioEssays* 1998;20(3):195–99.
- Wheeler JB, Reed CE. Epidemiology of esophageal cancer. *Surg Clin North Am*. 2012; 92: 1077-87.
- Wild CP, Lawb GR, Romanb E. Molecular epidemiology and cancer: promising areas for future research in the post- genomic era. *Mutation Research*. 20002;499, 3–12.
- Winters ZE, Hunt NC, Bradburn MJ, Royds JA, Turley H, Harris AL, Norbury CJ. Subcellular localisation of cyclin B, Cdc2 and p21(WAF1/CIP1) in breast cancer. association with prognosis. *Eur J Cancer* 2001; 37: 2405-12.
- Wohlschlegel JA, Dwyer BT, Takeda DY, Dutta A. Mutational analysis of the Cy motif from p21 reveals sequence degeneracy and specificity for different cyclin-dependent kinases. *Mol Cell Biol*. 2001;21(15):4868–74.
- Wu C, Wang Z, Song X, Feng XS, Abnet CC, He J et al. Joint analysis of three genome-wide association studies of esophageal squamous cell carcinoma in Chinese populations. *Nat Genet*. 2014; 46:1001–06.
- Wu MT, Wu DC, Hsu HK, Kao EL, Yang CH, Lee JM. Association between p21 codon 31 polymorphism and esophageal cancer risk in a Taiwanese population. *Cancer Letters*. 2003;201:175-80.

- Wu S, Cetinkaya C, Munoz-Alonso MJ, Von Der Lehr N, Bahram F, Beuger V, et al. Myc represses differentiation-induced p21^{CIP1} expression via Miz-1-dependent interaction with the p21 core promoter. *Oncogene*. 2003;22 (3):351–60.
- Wu X, Gu J, Grossman HB, Amos CI, Etzel C, Huang M, et al. Bladder cancer predisposition: a multigenic approach to DNA-repair and cell-cycle-control genes. *Am J Human Genetics*. 2006;78:464-79.
- Wu Z, Zheng S, Yu Q. The E2F family and the role of E2F1 in apoptosis. *Int. J Biochem Cell Biol*. 2009;41(12):2389–97.
- Xia W, Chen JS, Zhou X, Sun PR, Lee DF, Liao Y, et al. Phosphorylation/cytoplasmic localization of p21^{Cip1}/WAF1 is associated with HER2/neu overexpression and provides a novel combination predictor for poor prognosis in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2004;10:3815-24.
- Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinase, *Nature* 1993;366:701–04.
- Xu H, Wang Z, Jin S, Hao H, Zheng L, Zhou B, et al. Dux4 induces cell cycle arrest at G1 phase through upregulation of p21 expression, *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;446 (1):235–40.
- Yagi A, Hasegawa Y, Xiao H, Haneda M, Kojima E, Nishikimi A, et al. GADD34 induces p53 phosphorylation and p21/WAF1 transcription, *J Cell Biochem*. 2003;90 (6):1242-49.
- Yang X, Zhu H, Qin Q, Yang Y, Yang Y, Cheng H, et al. Genetic variants and risk of esophageal squamous cell carcinoma: a GWAS-based pathway analysis. *Gene* 2015;556: 149-52.
- Yin D, Jiang Y, Zhang S, Wang N, Lu Y, Wei H, et al. No association between p21 Gene rs1059234 polymorphisms and risk of endometrial cancer among han women in northeast China. *Cell Biochem Biophys*, 2015;71:167-71.
- Yu M, Wang H, Xu Y, Yu D, Li D, Liu X, et al. Insulin-like growth factor-1(IGF-1) promotes myoblast proliferation and skeletal muscle growth of embryonic chickens via the PI3K/Akt signalling pathway. *Cell Biol Int*. 2015;39(8):910–22.
- Zhang HZ, Jin GF, Shen HB. Epidemiologic differences in esophageal cancer between Asian and Western populations. *Chin J Cancer* 2012;31:281-86.
- Zhang W, Kornblau SM, Kobayashi T, Gambel A, Claxton D, Deisseroth AB. High levels of constitutive WAF1/Cip1 protein are associated with chemoresistance in acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res* 1995;1:1051-57.
- Zhang Y. Epidemiology of esophageal cancer. *World journal Gastroenterology*. 2013;19(34): 5598-606.
- Zheng L, Tang W, Shi Y, Chen S, Wang X, Wang L, et al. p21 rs3176352 G.C and p73 rs1801173 C.T Polymorphisms are Associated with an Increased risk of esophageal cancer in a Chinese population. *PLoS ONE*. 2014;9(5),e9658.



ÖZGEÇMİŞ

06.08.1992 tarihinde Van'da doğan Burak Muğdat KARAN, ilk öğrenimini 1998-2006 yılları arasında Van Mimar Sinan İlköğretim okulunda okuyarak mezun olmuştur. Lise öğrenimini 2006-2010 yılları arasında Van İMKB Anadolu Öğretmen Lisesi'nde tamamlamıştır. Lisans Öğrenimini ise 2011-2016 yılları arası Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde tamamlamıştır.

2016 yılında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başlamıştır. 2017 yılında Milli Eğitim Bakanlığının Yurt Dışına Yüksek Öğrenim Görme Programı olan YLSY programına başvurmuş ve doktora öğrenimi için yurt dışına çıkma hakkı kazanarak resmi bursiyer olmuştur.

EKLER

EK1. Etik Kuru Kabul Belgesi

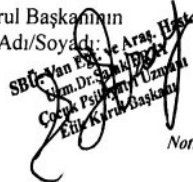
	KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU			
Versiyon No :12	Yayın Tarihi: 01.11.2014	Revizyon No :02	Revizyon Tarihi: 28.02.2017	Sayfa sayısı :1/1

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Türkiye'nin Doğu Anadolu popülasyonunda özofagus kanseri ve p21 polimorfizmleri arasındaki ilişki
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	



ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Van Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Süphan Mahallesi Hava Yolu Kavşağı 1. Kilometre Galericiiler Sitesi Karşısı C/Blok 4.Kat. No:128 / VAN
	TELEFON	0(432) 215 7601 Dahili 23650
	FAKS	0(432) 212 1954
	E-POSTA	Vaneah.etikkurulu@saglik.gov.tr

BASVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Yrd. Doç.Dr.Zehra Kaya			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Biyoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Van YYÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ABD			
	VARSA İDARI SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI	Doç.Dr. Yasin Tülüce			
	DESTEKLEYİCİ	Van YYU BAP birimine proje olarak başvurulacaktır.			
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
FAZ 4		<input type="checkbox"/>			
Gözlemsel ilaç çalışması		<input type="checkbox"/>			
Tıbbi cihaz klinik araştırması		<input type="checkbox"/>			
In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		<input type="checkbox"/>			
İlaç dışı klinik araştırma	<input checked="" type="checkbox"/>				
Diğer ise belirtiniz: Girişimsel olmayan klinik araştırma					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

Etik Kurul Başkanı
Unvanı/Adı/Soyadı: Yrd. Doç. Dr. Zehra Kaya
İmza:


Yrd. Doç. Dr. Zehra Kaya
Çocuk Psikiyatrisi Uzmanı
Etik Kurulu Başkanı

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

	KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU	
Versiyon No :12	Yayın Tarihi: 01.11.2014	Revizyon No :02
		Revizyon Tarihi: 28.02.2017
		Sayfa sayısı :1/2

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Türkiye'nin Doğu Anadolu popülasyonunda özofagus kanseri ve p21 polimorfizmleri arasındaki ilişki
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama				
	SİGORTA					
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ					
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	7500				
	ILAN					
	YILLIK BİLDİRİM					
	SONUÇ RAPORU					
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ					
DIĞER:						
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 2017/7	Tarih: 28.09.2017				
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gereke, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplanan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.					

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Uzm.Dr. Şafak ERAY




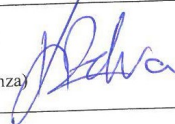

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Uzm.Dr. Şafak ERAY	Çocuk Psikiyatri Uzmanı	VEAH	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[İmza]</i>
Yrd.Doç.Dr. Sinemis ÇETİN DAĞLI	Halk sağlığı uzmanı	YYÜH	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[İmza]</i>
Yrd.Doç.Dr. Harun ARSLAN	Radyoloji Uzmanı	YYÜH	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[İmza]</i>
Yrd.Doç.Dr. Necatı ALMALI	Genel cerrahi uzmanı	YYÜH	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[İmza]</i>
Av. Adem ŞAHİN	Avukat	İl.sag.Müdürlüğü	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[İmza]</i>
Dr. Semra GÜMÜŞ GÜNDOZ	Aile Hekimliği	İl Halk Sağ. Müd.	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[İmza]</i>
Otomasyon. Coşkun ALPATA	Sivil	VEAH	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[İmza]</i>
Müh. Alper BOZAN	Biyomedikal	VEAH	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[İmza]</i>
Yrd.Doç.Dr. Funda AYDIN	Analitik kimya	YYÜH	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[İmza]</i>
Dr. Ecz. Nejdar Gonca BOZKURT	Farmakoloji alanı, Doktora	Serbest Eczacı	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[İmza]</i>
Opr. Dr. Onur GOKMEN	Göz Hastalıkları Uzmanı	VEAH	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[İmza]</i>
Uzm.Dr. Yüksel Gülen ÇİÇEK	Biyokimya Uzmanı	VEAH	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[İmza]</i>
Uzm.Dr. Çayan ÇAKIR	Kardiyoloji Uzmanı	VEAH	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[İmza]</i>

Etik Kurul Başkanı
Unvanı/Adı/Soyadı: **Uzm.Dr. Şafak ERAY**
İmza: **SBÜ. Van. Uzm.Dr. Şafak ERAY**
Çocuk Psikiyatri Uzmanı
Etik Kurul Başkanı

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

Ek 2. Tez Orjinallik Raporu

Ek 2. Tez Orjinallik Raporu

	<p style="text-align: center;">T.C. VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ Sağlık Bilimleri Enstitüsü</p>	
LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU		
Tarih: 21/09/2018		
Tez Başlığı / Konusu: Türkiye'nin Doğu Anadolu popülasyonunda özofagus kanseri ve p21 polimorfizmleri arasındaki ilişki		
Yukarıda başlığı/konusu belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 46 sayfalık kısmına ilişkin, 17/09/2018. tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Tornitin .intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orjinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 9 (Dokuz) dur.		
Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:		
<ul style="list-style-type: none">- Kabul ve onay sayfası hariç,- Teşekkür hariç,- İçindekiler hariç,- Simge ve kısaltmalar hariç,- Gereç ve yöntemler hariç,- Kaynakça hariç,- Alıntılar hariç,- Tezden çıkan yayınlar hariç,- 7 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 7 words)		
Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.		
Gereğini bilgilerinize arz ederim.		
Tarih ve İmza 		
Adı Soyadı: Burak Muğdat KARAN Öğrenci No:169302006 Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Programı: Tezli Yüksek Lisans Statüsü: Y.Lisans <input checked="" type="checkbox"/> Doktora <input type="checkbox"/>		
DANIŞMAN ONAYI UYGUNDUR (Unvan, Ad Soyad, İmza) 	ENSTİTÜ ONAYI UYGUNDUR (Unvan, Ad Soyad, İmza) 	

Ek 3. Anket Formu

Kategori					
Teşhis tarihi					
Adı-Soyadı					
Telefon no					
Cinsiyet	Erkek	Kadın			
Yaş					
Doğum yeri- memleketi					
Meslek					
Yaşadığı yer	Köy	şehir			
Tedavi	Evet	Hayır			
Kardeş sayısı					
Ailede Kanser	var	yok	Akrabalık derecesi	Hangi kanseri	
Obezite	Boy	kilo			
Sigara kullanımı	var	yok			
Alkol kullanımı	var	yok			
Sıcak Çay Tüketimi	var	yok	Günlük kaç bardak		
Meyve Tüketimi	var	yok	Günlük?	Haftada kaç gün?	
Beslenme Şekli	Genellikle zeytinyağlı	Genellikle kırmızı et	Abur cubur	Hazır gıda ağırlıklı	Organik ağırlıklı
Otlu peynir tüketimi					
Tandır dumanı	Ekmek pişirme Haftalık?				
Reflü	var	yok			
Başka hastalıkları var mı?					
Histopatolojik Durumu	SCC	ADC	Diğer?hangisi		
TNM Sınıflandırması	<u>Primer Tümör</u>	<u>Bölgesel Lenf Bezleri</u>	Uzak Metastaz		
	TX T0 Tis T1 T2 T3 T4	NX N0	M0 M1		
Evreleme	Evre0	Evre1	EvreIIA EvreIIB	EvreIII	EvreIV
Tümörün Yerleşim Yeri	Servikal	Üst torasik	Orta torasik	Alt torasik	Kardia
Metastaz	var	yok			

Ek 4. Hasta Onay Formu

VAN BÖLGE EĞİTİM ve ARAŞTIRMA HASTANESİ **ARAŞTIRMA İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR FORMU**

Araştırmaların adı: Türkiye'nin Doğu Anadolu popülasyonunda özofagus kanseri ve p21 polimorfizmleri arasındaki ilişki.

Protokol No: Bağımsız projeler

Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yürütülen ve yukarıda adı geçen çalışmaya davet ediliyorsunuz.

Araştırmamızın konusu özofagus kanserinde genetik yatkınlığın ayrıntılarının çalışılmasıdır. Biz bu çalışmayı Türkiye' de sizinle aynı hastalığa sahip bireylere yardımcı olabilecek bilgilere ulaşmak, yeni tedavilere ışık tutmak ve hastalığın ailesel yatkınlığını ortaya koymak amacıyla planladık. Özofagus kanseri dünyada ölümlerden sorumlu önemli bir hastalıktır. Vücuttaki hücrelerin kontrolsüz çoğalmasıyla oluşan hastalık, zamanında ve doğru tedavi edilmezse büyük bir tehlike arz etmektedir. Özofagus kanseri ve diğer kanserlerde hastalık ile ilgili çeşitli belirteçlerin bulunması, hastalık sürecinde gözlenen çeşitli değişimlerin saptanması erken tanı koyulması ve yeni tedavi stratejileri geliştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Çalışmamızda p21 genindeki polimorfizmlerin bizim toplumumuzda yatkınlık sebebi olup olmayacağına açıklık getirecektir. Böyle genelerdeki değişimlerin tespit edilmesi ileride geliştirilecek tedavi seçeneklerini de etkileyebilir.

Şikâyetiniz nedeniyle başvurduğunuz klinikte sizden alınan kan örneği çalışmamızda kullanılacak ve sağlıklı kişilerin kan analizleriyle karşılaştırılacaktır. Çalışmaların sonucuna göre kanlarınızdan elde edilen DNA örnekleri ileriki moleküler genetik çalışmalar için de kullanılacaktır. Sizden çalışmayla ilgili hiçbir ücret talep edilmeyecek ve herhangi bir ek girişim yapılmayacaktır.

Çalışmaya katılmanız halinde kişisel bilgileriniz ve sonuçlarınız kesinlikle gizli tutulacaktır. Çalışma ile danışmak istediğiniz bir konu olduğunda aşağıda telefon numarası bulunan araştırmacıyla temasa geçebilirsiniz.

Zehra KAYA, 05308801112

Bu çalışmalara herhangi bir etki veya baskı altında kalmadan gönüllü olarak katılmanızı istiyoruz. İstedığınız her an çalışmadan çekilme hakkına sahipsiniz. İsminiz kesinlikle gizli tutulacaktır.

Katılımcının Ad-Soyadı:

Doğum Tarihi:

Adresi:

Tel. No:

Kanuni Yeterliliği Olmayan Hastalar İçin Veli / Vasinin Adı-Soyadı:.....

Adresi:

Tel. No:

HASTA ONAY FORMU

Çalışmaların Adı: Türkiye'nin Doğu Anadolu popülasyonunda özofagus kanseri ve p21 polimorfizmleri arasındaki ilişki.

Protokol No: Bağımsız proje

Hasta bilgilendirme formunda verilen tüm bilgileri okudum ve anladım. Şikayetimin nedeni ile tetkik için alınan kan örneğinin bir kısmının gerekli çalışmalarda kullanılmasında bir sakınca görmüyorum. Bu çalışmaya hiç kimsenin etkisi altında kalmadan tamamen kendi rızamla gönüllü olarak katılmayı kabul ediyorum.

Hasta Adı Soyadı

İmza

Tarih

Tarih:

Araştırmada yardımcı araştırmacı

Hekim Adı-Soyadı: : Dr. Öğrt. Üye. Necat ALMALI

İmza :

Araştırmadan Sorumlu

Araştırmacı Adı-Soyadı: Dr. Öğrt. Üye. Zehra KAYA

İmza :